



HAL
open science

Rôle des récepteurs adénoenergiques A2A dans la maladie d'Alzheimer

Kévin Carvalho

► **To cite this version:**

Kévin Carvalho. Rôle des récepteurs adénoenergiques A2A dans la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS030 . tel-03815843

HAL Id: tel-03815843

<https://theses.hal.science/tel-03815843>

Submitted on 15 Oct 2022

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

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

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

Présentée par

Kévin CARVALHO

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

Rôle des récepteurs adénoenergiques A_{2A} dans la maladie d'Alzheimer

Soutenue publiquement le 14 octobre 2019 devant le jury composé de :

Madame le Pr. Nicole Déglon	Rapporteur
Monsieur le Pr. Rodrigo Cunha	Rapporteur
Madame le Dr. Sabine Lévi	Examineur
Madame le Dr. Malika Hamdane	Examineur
Monsieur le Dr. Eric Boué-Grabot	Examineur
Monsieur le Dr. Emmanuel Brouillet	Président du jury
Monsieur le Dr. David Blum	Directeur de thèse

**À mes parents,
À mes grands-parents,
À mes amis,
À Diana.**

Remerciements

Je suis arrivé au Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert (JPArC) dans l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » (UMR-S1172) en janvier 2015 lors de mon Master 1. A l'heure où j'écris ces pages, cela fait donc quatre ans et huit mois. Cette longue expérience me laisse un souvenir agréable et impérissable, tant sur le plan professionnel qu'humain.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, le **Dr. Nicole Déglon**, le **Dr. Rodrigo Cunha**, le **Dr. Sabine Lévi**, le **Dr. Malika Hamdane**, le **Dr. Eric Boué-Grabot** et le **Dr. Emmanuel Brouillet**, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'appartenir à ce jury de thèse afin d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le **Dr. Nicole Déglon** et le **Dr. Rodrigo Cunha** d'avoir accepté le rôle de rapporteur de thèse.

Je tiens ensuite naturellement à remercier le **Dr. Luc Buée** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe « Alzheimer & Tauopathies ». Je vous remercie de m'avoir soutenu tout au long de ce parcours et d'avoir été disponible malgré vos responsabilités croissantes au fil des années. La réussite de ces travaux de recherche n'aurait pas été possible sans vos conseils et votre appui. Merci pour tous ces bons moments passés dans votre équipe, avec une mention particulière pour les fêtes de Noël. Cette danse endiablée restera gravée dans ma mémoire à jamais :) !

J'adresse un immense merci à mon directeur de thèse le **Dr. David Blum**. Je me souviens encore du premier entretien que j'ai passé avec vous. Vous avez su me convaincre en une poignée de minutes de m'orienter vers la recherche en neurosciences. Ensuite, vous m'avez accompagné tout au long du master 2 jusqu'au concours, ce qui m'a permis de décrocher le précieux sésame. Vous m'avez transmis votre passion de la science et j'espère être à la hauteur de vos attentes à l'avenir. En plus de vos qualités humaines, vous êtes toujours disponible, physiquement ou par mail, si bien qu'on sait qu'on peut toujours compter sur vous. Chaque année à vos côtés a apporté son lot de leçons et de découvertes. Grâce à vous, j'ai pu également voyager à l'autre bout du monde afin de participer à des congrès internationaux. Il me semble même que vous ayez joué à cupidon en m'envoyant en

Allemagne... J'espère que nous continuerons à travailler ensemble après mon départ et que je marcherai dans vos pas.

Je remercie de tout cœur le **Dr. Emilie Faivre**. Ma chère Emilie, tu as eu la lourde tâche de me prendre sous ton aile à mon arrivée en master 1 et de me former aussi bien sur les aspects techniques que scientifiques. Tu m'as permis de m'épanouir dans ce laboratoire, des premiers pipetages jusqu'aux tests de comportements. Tu as toujours été à l'écoute et enclin à prodiguer tes conseils. Je te remercie de m'avoir constamment fait progresser et de toujours me pousser à m'améliorer. Ces résultats de thèse n'auraient pas été possibles sans toi. Merci également d'avoir relu ce manuscrit durant tes vacances et de me donner encore une fois tes conseils :). Nous avons passé de très bons moments que ce soit à St Sauveur ou en congrès. Tes qualités humaines et professionnelles font de toi une personne exceptionnelle. Merci encore pour ton soutien sans failles tout au long de ces années.

Je remercie également les Dr. **Malika Hamdane, Valérie Buée-Scherrer, Morvane Colin, Marie-Christine Galas, Sophie Halliez, Didier Vieau, Bruno Lefebvre, Nicolas Sergeant, Valérie Vingtdeux, Sandrine Humez, Vincent Huin, Bernard Sablonnière** qui m'avez tous aidés à me construire professionnellement et pour votre soutien. Je remercie particulièrement **Malika** qui m'a énormément appris sur la biologie moléculaire et qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions et me soutenir tout au long du master et de la thèse. Merci à **Morvane** pour nos échanges scientifiques et vos leçons de statistiques. Merci à **Marie** pour vos questions qui ont toujours été très constructives. Un grand merci également à **Bruno** pour tous ces petits moments « off » et oui je vous promets de quitter ce labo un jour. Un grand merci à **Bernard** pour votre soutien et vos pas de danses ! Je te remercie **Vincent** pour tes conseils et ta bonne humeur. Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement **Didier** d'être un professeur d'université formidable et captivant, j'ai beaucoup appris à travers votre enseignement et si je suis ici aujourd'hui, vous y êtes probablement pour beaucoup.

Je souhaite également remercier également nos collaborateurs, les docteurs **Luisa V. Lopes, Tiago F. Outeiro** et **Cécile Delarasse**, qui m'ont fait confiance dans la réalisation de leurs projets et également pour leurs conseils scientifiques et leur gentillesse.

Je remercie **Victoria**, mon rayon de soleil. Travailler à tes côtés a toujours été un plaisir, de la salle de stéréotaxie à la chambre à -20°C en passant par la microscopie. Peu de choses dans la vie ne me font plus plaisir que de recevoir un de tes messages pour parler boulot le dimanche matin quand j'ouvre les yeux :) Je pense que nous avons choqué une bonne partie des stagiaires lors de nos débats houleux et animés au milieu du laboratoire. *What a disaster ?!* Nous avons très rapidement noué une vraie amitié et je compte bien te rendre régulièrement visite à l'avenir dans ta belle région natale.

Je remercie naturellement toutes les personnes qui font ou ont fait partie de notre groupe. Merci à **Lucrezia**, mon italienne préférée, de m'avoir forcé à parler anglais tous les jours. J'ai beaucoup appris à tes côtés. En tant que voisin, j'ai aussi appris que parfois l'amitié peut s'arrêter à un cahier posé entre deux bureaux :). Merci à **Hamza**, tu es sans doute la personne la plus gentille et honnête que je connaisse. Je suis très heureux de l'idée que tu reviennes parmi nous. Merci à mon fidèle acolyte **Ouada**, vivement que tu reviennes finir ta thèse ici ! Merci à **Aude** et **Céline** pour tous ces bons moments passés en votre compagnie. Je remercie également toutes les personnes qui se sont succédées et qui ont tous contribué à rendre nos longues journées de travail plus enrichissantes : **Cristina**, **Helena** et **Thibaut**, mon premier master 1.

Un énorme merci à **Isabel**, ma portugaise préférée si je puis me permettre. Le courant est bien passé entre nous dès ton premier passage au labo, puis tu as su me faire me mettre à l'aise lors de mon court séjour à Göttingen. Je te dois sans doute beaucoup plus que je n'en ai conscience, merci pour tout !

Un grand merci à mes co-thésards. Merci à **Alban**, **Anthony**, **Maxime** et **Simon** pour votre bonne humeur et votre sagesse :) Merci à **Coline** pour ton sourire, ta gentillesse et tes conseils qui m'ont toujours beaucoup aidé à avancer durant cette thèse. Merci à **Caroline**, ma voisine et geek musclée préférée <3 Merci à **Clément** et **Mégane** d'avoir toujours été là et d'être des personnes formidables ! Merci à **Mélissa** et **Marie A** pour vos conseils et votre sourire. Merci à **Romain** pour nos échanges et tes conseils. Merci à **Sarah G**, ma petite protégée, d'être toujours là pour m'accueillir avec un sourire et me proposer un café. Enfin, merci à la nouvelle génération : **Elodie** pour tes talents de comédienne, **Marine** pour ta gentillesse et nos discussions scientifiques (toujours), **Thomas R** pour ton pragmatisme légendaire, **Marie T** pour ton sourire et ta visite guidée de Marseille :) Merci à **Sébastien G**

pour nos petits moments de détente glaçants ! Je remercie également **Sarra**, qui va démarrer cette aventure qu'est la thèse, je te souhaite que celle-ci se passe aussi bien que la mienne ! Enfin je souhaiterais insister sur mes experts qui ont pris le temps, parfois même pendant leur dimanche matin, de relire ce manuscrit : **Marine, Mégane, Elodie, Clément, Marie T.** Votre aide m'a été inestimable et je ne l'oublierai pas...

Je souhaite également remercier les différents post-doctorants avec qui j'ai pu interagir. Merci à **Claire**, tu étais là depuis que je suis arrivé. Nous avons passé de très bons moments ensemble, tu m'as beaucoup apporté tant sur le plan scientifique sur le plan humain. Je n'oublierai pas nos aventures avec toi et **Mégane** à San Diego ! Merci à **Claudia** pour ton sourire et tes leçons d'italien. Tu es une personne au grand cœur et très agréable. Merci à **Maryline** pour tous ces bons moments passés en ta compagnie. Merci à **Catherine**, tu es une personne formidable et tes conseils scientifiques m'ont toujours été inestimables. Enfin, merci à **Alejandro** pour ta joie de vivre espagnole.

Je remercie également tous les ITA pour leurs précieux conseils. Mes premiers remerciements vont à **Domi** qui m'a presque tout appris sur le western blot et la qPCR durant le master 2 et m'a transmis sa passion de la recherche. Avec ta bonne humeur légendaire, tu m'as permis sans soucis de m'intégrer dans l'équipe. Techniquement, tu m'as énormément appris. Je fais partie des dernières personnes que tu as formées avant de partir à la retraite, ce qui est pour moi un cadeau inestimable. Merci à **Sabiha** pour ton sourire et ton calme en toutes circonstances. Même après avoir été sollicité par vingt personnes tu es toujours prête à aider. J'ai aussi hâte de goûter à nouveau à ton fameux thé... Merci également à **Raphaëlle** pour toutes ces conversations intéressantes, passant d'une question scientifique à qui sera le prochain personnage à disparaître dans Game of Thrones ou le prochain méchant dans Star Wars... Merci à **Séverine** pour tout ce que tu as fait pour nous et de m'avoir appris le clonage et la culture primaire. Tu es une personne au grand cœur et j'ai apprécié passer ces moments en ta compagnie. Merci à **Sébastien C** pour nos moments de détente. Tu m'as également beaucoup appris sur la biologie moléculaire. Merci à **Anna**, pour ton sourire et tout ce que tu fais pour nous, à commencer par le chocolat blanc fourré à la noix de coco (rires) ! Un grand merci à **Florian** pour tes conseils avisés et ta sympathie. Merci à **Amaury** et **Louis-Adrien** pour leur bonne humeur ! Merci à **Mathilde** pour nos discussions toujours très scientifiques (rires). Merci à Espérance, notre petite fée à la main verte. Ton sourire et ta bonne humeur vont me manquer. Merci à **Thomas C** pour ta bonne humeur. Merci à **Thomas B**, que la force

des astrocytes soit avec toi ! Merci à **Alexandre**, tu apportais beaucoup de dynamisme et tu m'as sauvé la mise à plusieurs reprises ;) Merci à **Chloé** pour tes créneaux de PCR ;) Enfin, je remercie **Sébastien D** pour ta joie de vivre.

Un grand merci tout particulier à **Sarah L**, qui est arrivée en même temps que moi. Tu as su t'imposer comme une des personnes les plus indispensables du labo. Ton sourire et ton grand cœur font que tu laisses une trace indélébile dans la mémoire des gens qui t'ont côtoyée. Le labo ne sera jamais plus pareil sans toi. Merci de m'avoir aidé à réaliser les cultures primaires et les infections, ton soutien a été inestimable. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans le sud :) J'en viens à mon cher **Théo**, mon fidèle acolyte durant cette thèse. Je me souviens encore t'avoir vu arriver dans le labo avec plein d'étoiles dans les yeux, bien que j'y ai rapidement mis un terme, désolé :(Ta présence a été un tournant je pense dans la vie du labo, tout comme Sarah, il y aura un avant et un après Théo. Tu as toujours su te rendre disponible pour aider ceux dans le besoin et prendre le temps de former les nouveaux arrivant. Mon seul regret est peut-être de ne pas avoir plus travaillé avec toi. J'espère que tu te plairas dans ta nouvelle vie d'informaticien !

Je remercie l'ensemble des personnes qui se sont succédées dans l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » au cours de ces dernières années. Chacun a, à sa manière, contribué à ce bon souvenir que je garderai du laboratoire.

Je remercie également nos équipes voisines. Merci à **Nour, Monica, Sam, Nadia, Danielle, Anne, Cécile, Emilie C, Sarah, Maria, Daniela, Giuliana, Jérôme, Manon, Valérie, Mégane, Marion** et **Sara**. Merci pour tous ces moments de détente passés en votre compagnie. Un merci tout particulier à **Paolo**, tu es quelqu'un de formidable, j'ai autant apprécié de travailler que d'aller boire un verre avec toi. Je remercie également **Matthieu, Jean-Marc, Antoine, Alessia, Elodie** et **William** pour vos conseils et votre sympathie.

Je souhaite adresser un énorme merci à tout le personnel du Centre de recherche Jean-Pierre Aubert. Grâce à vous, nous pouvons tous travailler dans d'excellentes conditions sans nous soucier de tous les « à côtés ». Merci à **Céline** pour votre disponibilité, votre écoute et vos conseils. Vous avez toujours répondu avec diligence aux problématiques du laboratoire, peu importe le jour ou l'heure. Merci à **Nathalie**, tu as toujours été le sourire qui nous accueille à notre entrée dans le laboratoire. Tu as toujours été là pour nous. Je ne mentionne

même pas ton travail qui a toujours été exemplaire. Merci à **Sophie**, le deuxième sourire qui nous accueille. Ta joie de vivre et ta gentillesse forcent l'admiration. Tu as toujours été là pour nous. Grâce à toi on peut se déplacer à l'autre bout du monde pour un congrès sans avoir le moindre souci à se faire, merci pour tout ! Un énorme merci à **Michèle**, notre dernière fée du secrétariat, tu as toujours été adorable. Ton départ va laisser un grand vide, je te souhaite le meilleur pour ta retraite ! Merci à **Charlotte** pour ta joie de vivre (on se demande de qui tu tiens ?) et nos moments de détente. Tu es une fille formidable et je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci à **Staëlle** pour son sourire et son travail dans l'animation scientifique. Merci à **Maxime** pour nos échanges. Merci à **Pierre** pour ses conseils avisés sur la qPCR et son écoute. Je remercie également **Thomas** qui lui aussi travaille dans l'ombre mais nous soulage énormément ! Tu sais dynamiser le labo dès que tu y entres, merci pour nos moments de détente ! Merci à **Karim, Laifa** et **Olivier** pour votre gentillesse et votre travail au quotidien !

Je tiens à remercier le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur d'avoir financé cette thèse. Je souhaite également remercier l'école doctorale qui a toujours été là pour mes questions et qui m'a aidé à en arriver là. Un grand merci à **François** pour vos conseils et votre sympathie, à **Laurence** et à **Marion** pour votre disponibilité et votre gentillesse, et enfin un merci tout particulier à **Hélène** pour votre disponibilité et votre aide dans ces derniers instants de la thèse.

Je souhaiterais remercier également ma famille qui m'a toujours soutenu depuis le premier jour, peu importe les décisions que je prenais. Je remercie tout particulièrement mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui et qui m'ont tant aidé. Je remercie également mes grands-parents qui ont toujours été fiers de mon parcours.

Je souhaite finir ces remerciements par ma moitié, **Diana**. Nous nous sommes rencontrés grâce à cette thèse. Qui aurait pu croire qu'un court séjour à Göttingen, en Allemagne, puisse avoir de si grandes répercussions. Merci de m'avoir soutenu tout au long de ces deux dernières années. Jamais je ne saurai te dire à quel point je t'aime. Chaque jour passé à tes côtés est le plus beau jour de ma vie.

Enfin, je remercie toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées au fil de toutes ces rencontres. Vous avez tous contribué à la réussite de ce projet de thèse.

Résumé

L'accumulation neuronale de protéines tau hyperphosphorylées et agrégées (« pathologie tau ») est corrélée au déclin cognitif dans la maladie d'Alzheimer. Les mécanismes liant tau à la perte de mémoire demeurent néanmoins mal connus. Différentes données épidémiologiques et expérimentales suggèrent que la consommation régulière de caféine réduit le risque de développer la maladie d'Alzheimer ainsi que les lésions et déficits cognitifs associés. Les effets protecteurs de la caféine ont été attribués au blocage des récepteurs à l'adénosine A_{2A} ($A_{2A}Rs$), qui sont retrouvés augmentés dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, en corrélation avec le développement de la pathologie tau et des déficits cognitifs. Ces observations suggèrent ainsi un lien entre la dysrégulation cérébrale des récepteurs A_{2A} , le développement de la pathologie tau et des déficits de mémoire dans la maladie d'Alzheimer. De manière intéressante, les récepteurs A_{2A} sont dérégulés à la fois au niveau neuronal mais aussi au sein des astrocytes, sans que l'impact respectif de ces changements sur l'évolution pathologique de la MA ne soit connu. Dans ce contexte, l'objet de ce travail de thèse est d'explorer la relation entre la dysrégulation des $A_{2A}Rs$, la pathologie tau et les troubles synaptiques/cognitifs associés, en reproduisant les dysrégulations neuronale et astrocytaire du récepteur dans un nouveau modèle transgénique de la maladie d'Alzheimer.

Nous avons développé un modèle conditionnel (Tet-Off) permettant la surexpression du $A_{2A}R$ dans les neurones $CaMKII^+$ ou dans les astrocytes $GFAP^+$. Ce modèle a été croisé avec la lignée de souris THY-Tau22, qui développe progressivement une pathologie tau hippocampique associée à un déclin des fonctions mnésiques ainsi qu'à un développement de processus neuroinflammatoires et une perte synaptique. Dans les différents groupes expérimentaux, nous avons notamment évalué les conséquences de la surexpression neuronale ou astrocytaire des récepteurs sur le développement de la pathologie tau et les altérations fonctionnelles associées (apprentissage et mémoire). Ces travaux chez la souris s'accompagnent également d'investigations *post-mortem* chez des patients atteints de dégénérescences lobaires fronto-temporales présentant des agrégats de tau (FTLD-tau).

Nos travaux démontrent d'une part une augmentation neuronale du récepteur $A_{2A}R$ dans le cortex temporal de patients atteints de FTLD-tau avec mutation du gène *MAPT* P301L, une tauopathie pure. D'autre part, la surexpression neuronale du $A_{2A}R$ chez les souris THY-Tau22, mimant les modifications observées chez les patients, conduit à une augmentation hippocampique de l'hyperphosphorylation de tau, associée à une perte des synapses glutamatergiques, en lien avec la production microgliale de protéines du complément C1q, conduisant à une aggravation des troubles de la mémoire. Parallèlement, nous montrons que la surexpression astrocytaire du $A_{2A}R$ exacerbe les altérations de mémoire spatiale des souris THY-Tau22, en lien avec une augmentation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau ainsi que des processus neuroinflammatoires hippocampiques associés.

L'ensemble de ces données suggèrent que la dysrégulation des $A_{2A}Rs$ retrouvée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais aussi de FTLD-tau contribue au développement des troubles cognitifs, en favorisant l'émergence de la pathologie Tau ainsi que les pertes synaptiques associées, via des changements délétères de la communication neuro-gliale. Ces données suggèrent ainsi que le blocage des récepteurs adénosinergiques A_{2A} est une option thérapeutique à envisager plus avant dans le contexte des tauopathies.

Abstract

Neuronal accumulation of hyperphosphorylated and aggregated tau proteins (referred to as “tau pathology”) is correlated with cognitive decline in Alzheimer’s disease (AD) but the mechanisms underlying tau-induced memory deficits remain unclear. Epidemiological and experimental studies pointed out that chronic caffeine consumption reduces AD risk, associated lesions as well as related cognitive deficits. These protective effects were ascribed to the blockade of adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}Rs), which have been found upregulated in AD patient’s brains in correlation with tau pathology development and cognitive deficits. These observations suggest a link between A_{2A}R dysregulation, tau pathology development and memory loss in AD. Interestingly, both neuronal and astroglial A_{2A}R appear to be dysregulated in AD, but the specific impact of each cell-specific change on AD progression remain unknown. In this context, the goal of this PhD work is to get insights towards the relationship between A_{2A}R dysregulation, tau pathology development and associated synaptic/cognitive deficits, by inducing neuronal or astrocytic A_{2A}R upsurge in a new transgenic mouse model of AD.

To address this question, we have developed a new conditional model (Tet-Off) allowing the A_{2A}R overexpression in CaMKII-positive neurons or GFAP-positive astrocytes. This model was crossed with THY-Tau22 mice, which progressively develops a hippocampal Tau pathology associated with memory decline, associated with neuroinflammatory processes and synaptic loss. In the different experimental groups, we have evaluated the consequences of neuronal or astrocytic upsurge of the A_{2A}Rs towards tau pathology and functional impairments (learning and memory). In addition, we also investigated post-mortem tissue of patients with frontotemporal lobar degeneration with tau aggregates (FTLD-tau).

First, we show a neuronal upsurge of A_{2A}R in the temporal cortex of FTDL-tau patients with *MAPT* P301L mutation, a pure tauopathy. The neuronal upregulation of A_{2A}R in THY-Tau22 mice, modeling these pathological changes, led to an hippocampal increase of tau hyperphosphorylation, associated with glutamatergic synapse loss, linked to the accumulation of the microglial complement protein C1q, leading to the worsening of spatial memory impairments. Additionally, we found that astrocytic A_{2A}R overexpression worsened spatial memory impairments of THY-Tau22 mice. These effects were associated with an increased Tau phosphorylation together with the upregulation of hippocampal neuroinflammatory processes.

Altogether, these data suggest that A_{2A}R dysregulation seen in the brain of AD and FTLD-tau patients contributes to the development of Tau-induced cognitive impairments by increasing tau pathology and associated synaptic loss through detrimental neuro-immune changes. These data suggest that the blockade of adenosinergic A_{2A} receptors is a therapeutic option to consider in the context of tauopathies.

Abréviations

A : adénine
A₁R : récepteur A₁
A_{2A}R : récepteur A_{2A}
A_{2B}R : récepteur A_{2B}
A₃R : récepteur A₃
AAV : virus adéno-associé
AC : adénylate cyclase
Ach : acétylcholine
ACoA : acétylcoenzyme A
ADA : adenosine déaminase
ADAM10 : *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*
ADK : adenosine kinase
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
AICD : *amyloid precursor protein intracellular domain*
AMP, ADP, ATP : adénosine mono-, di-, triphosphate
AMPA : récepteur à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
AMPc : adenosine monophosphate cyclique
AMPK : *AMP-activated protein kinase*
APP : précurseur du peptide amyloïde
ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
A β : peptide amyloïde β
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
C : cytosine
Ca²⁺ : calcium
CaMKII : protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante
CB1R : récepteur cannabinoïde 1
CBD : dégénération corticobasale
Cdk5 : *cyclin-dependent kinase*
CK1, 2 : caséine kinase 1, 2
Cl⁻ : chlorure
CNT2, 3 : *concentrative nucleoside transporter*
CoA : coenzyme A
CREB : *cAMP response element-binding protein*
cryoEM : *cryo-electron microscopy*
C-ter : C-terminale ou COOH
Cx : connexine
D1R, D2R : récepteur dopaminergique 1, 2
DAG : diacylglycérol
DAMP : *damage- ou danger-associated molecular patterns*
DNF : dégénérescence neurofibrillaire
DYRK1A : *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*
EAE : encéphalomyélite allergique expérimentale

E-LTP, E-LTD : *early long-term potentiation, early long-term depression*
ENT1, 2, 3, 4 : *equilibrative nucleoside transporter 1, 2, 3, 4*
ENTDP1 (ou CD39) : *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1*
FTLD-tau : *dégénérescence lobaire frontotemporale avec agrégats de tau*
G : *guanine*
GABA : *acide γ -aminobutyrique*
GAP : *jonctions communicantes*
GFAP : *protéine acide fibrillaire gliale ou Glial fibrillary acidic protein*
GLAST (ou EAAT1) : *sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 1 (excitotoxic Amino Acid Transporter 1)*
GLT-1 (ou EAAT2) : *glial high affinity glutamate transporter (excitotoxic Amino Acid Transporter 2)*
GPe : *globus pallidus externe*
GPI : *globus pallidus interne*
GSK3 β : *glycogen synthase kinase 3 β*
HGPRT : *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*
IP3 : *Inositol trisphosphate*
K⁺ : *potassium*
KPI : *Kunitz protease inhibitor*
L-LTP, L-LTD : *late long-term potentiation, late long-term depression*
LPS : *lipopolysaccharide bactérien*
LTD : *late long-term depression*
LTP : *long-term potentiation*
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*
MAPT : *microtubule-associated protein tau*
MARK : *MAP/microtubule affinity-regulating kinases*
Mg²⁺ : *magnésium*
mGluR5 : *récepteur métabotropique au glutamate 5*
MO : *oligodendrocyte myélinisant*
Na⁺ : *sodium*
NADH : *nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite*
NF-KB : *nuclear factor-kappa B*
NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
NMDAR : *récepteur au N-méthyl-D-aspartate*
NO : *monoxide d'azote*
NR2B : *N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B*
NT5E (ou CD73) : *Ecto-5'-Nucleotidase*
N-ter : *N-terminal ou NH₂*
OPC : *cellules précurseurs d'oligodendrocytes*
P2X, Y : *récepteurs purinergiques 2X, 2Y*
PAMP : *pathogen-associated molecular patterns*
Panx1 : *pannexine 1*
PART : *primary age-related tauopathy*
PD : *phosphodiesterase*
PDK : *proline directed kinase*
PHF : *filaments appariés en hélices ou paired helical filaments*
Pick : *maladie de Pick*
PIP2 : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*

PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PNP : Purine nucléoside phosphorylase
PP1, 2A : protéine phosphatases sérine/thréonine de type 1, 2A
PRR : pattern recognition receptor
PSP : paralysie supranucléaire progressive
PYCARD : PYD And CARD Domain Containing
RCPG : récepteur couple aux protéines G
ROS : espèce réactive de l'oxygène
SAH : S-adenosyl-L-homocystéine
SAHH : S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM : S-adenosyl-L-méthionine
SHMT : S-adenosyl methyl transférase
SNC : système nerveux central
SNC : substance noire *pars compacta*
SNr : substance noire *pars reticula*
T : thymine
U : uracile
UMP, UDP, UTP : uridine mono-, di-, triphosphates
vg : vector genome

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	22
LISTE DES TABLEAUX	24
INTRODUCTION	25
<i>PREAMBULE : LES ORIGINES DE LA VIE SUR TERRE</i>	25
CHAPITRE I : LE SYSTEME PURINERGIQUE	26
1. <i>Les purines : définition et structure</i>	26
1.1. Découverte des purines.....	26
1.2. Structure et classification des purines.....	26
1.3. Nucléosides et nucléotides purinergiques	27
2. <i>L'adénosine et ses dérivés</i>	29
2.1. Concentrations de l'adénosine et ses dérivés à l'échelle cellulaire.....	29
2.2. Production de l'ATP	29
2.3. Production de l'adénosine.....	30
2.4. Transport de l'adénosine.....	32
2.5. Dégradation de l'adénosine	33
3. <i>La signalisation purinergique</i>	33
3.1. Les purines comme molécules de signalisation	33
3.2. Mise en évidence de la signalisation des purines	34
3.3. Découverte des récepteur purinergiques.....	35
3.4. Les récepteur P2 sensibles aux nucléotides	36
3.4.1. Les récepteurs ionotropiques P2X.....	37
3.4.2. Les récepteurs métabotropiques P2Y	38
3.5. Les récepteurs P1 sensibles aux nucléosides.....	39
3.5.1. Les récepteur adénosinergique A ₁ (A ₁ R)	39
3.5.2. Récepteur adénosinergique A _{2A} (A _{2A} R)	40
3.5.3. Récepteur adénosinergique A _{2B} (A _{2B} R).....	41
3.5.4. Récepteur adénosinergique A ₃ (A ₃ R)	42
CHAPITRE II : ROLE DE L'ADENOSINE DANS LE CERVEAU	44
1. <i>Expression au niveau central des récepteurs à l'adénosine</i>	44
2. <i>Récepteurs adénosinergiques et neurones</i>	46
2.1. Principales fonctions des neurones	46
2.2. La plasticité synaptique	46
2.3. Modulation de l'excitabilité neuronale par les récepteurs à l'adénosine	48
3. <i>Récepteurs adénosinergiques et cellules gliales</i>	49
3.1. Les oligodendrocytes.....	50
3.2. Les astrocytes	50
3.3. Les cellules microgliales.....	52
3.4. Modulation des fonctions gliales par les récepteurs à l'adénosine.....	53

4. Adénosine et synapse tripartite	55
4.1. En condition basale	55
4.2. Lors d'une stimulation synaptique	56
4.3. Lors d'un excès de stimulation	58
5. Fonctions physiologiques et pathologiques de l'adénosine	60
5.1. Sommeil et insomnie	60
5.2. Barrière hémato-encéphalique et sclérose en plaques	60
5.3. Tonus adénoenergique et épilepsie	61
5.1. Régulation motrice et maladies neurodégénératives	62
5.1.1. Les ganglions de la base	62
5.1.2. La maladie de Huntington	64
5.1.3. La maladie de Parkinson	66
CHAPITRE III : MALADIE D'ALZHEIMER & TAUOPATHIES	68
1. La maladie d'Alzheimer	68
1.1. Epidémiologie	68
1.2. Les lésions caractéristiques	68
2. Le peptide amyloïde A β et la pathologie amyloïde	69
2.1. Gène et structure du précurseur du peptide amyloïde (APP)	69
2.2. Fonctions physiologiques du précurseur du peptide amyloïde (APP)	70
2.3. Clivage du précurseur du peptide amyloïde (APP)	71
2.4. Rôle pathologique du peptide A β	73
3. La protéine tau et la pathologie tau	74
3.1. Gène et structure de tau	74
3.2. Modifications post traductionnelles de tau	74
3.3. Processus d'agrégation de tau	76
3.4. Fonctions physiologiques de tau	77
3.5. Fonctions pathologiques de tau	78
3.6. Liens entre la protéine tau et le peptide amyloïde A β	80
3.7. La famille des tauopathies	81
4. La neuro-inflammation	83
4.1. Composante cellulaire	83
4.1.1. Réactivité microgliale	83
4.1.2. Réactivité astrocytaire	84
4.1.3. Rétrocontrôle neuronal	84
4.1.4. Système immunitaire périphérique	85
4.2. Conséquences pathologiques	85
4.2.1. Sur la pathologie amyloïde	85
4.2.2. Sur la pathologie tau	86
4.2.3. Sur l'intégrité neuronale et synaptique	86
5. Facteurs de risques	88

CHAPITRE IV : CAFEINE, RECEPTEURS ADENOSINERGIQUES ET MALADIE D'ALZHEIMER	89
1. <i>Café et maladie d'Alzheimer</i>	89
1.1. Café et caféine	89
1.2. Effets bénéfiques du café sur la maladie d'Alzheimer	91
2. <i>Caféine et modèles de la maladie d'Alzheimer</i>	92
2.1. Effets de la caféine sur la pathologie amyloïde	92
2.2. Effets de la caféine sur les modèles de pathologie tau	92
3. <i>A_{2A}R et modèles de la maladie d'Alzheimer</i>	93
3.1. Effets bénéfiques du blocage du A _{2A} R sur la pathologie amyloïde	93
3.1. Effets bénéfiques du blocage du A _{2A} R sur la pathologie tau	94
4. <i>A_{2A}R, vieillissement et maladie d'Alzheimer</i>	94
4.1. A _{2A} R et vieillissement	94
4.2. Dysrégulation cellulaire du A _{2A} R au cours de la maladie d'Alzheimer	95
OBJECTIFS DE LA THESE	97
MATERIELS ET METHODES	99
1. <i>Expériences réalisées sur tissus humain</i>	99
1.1. Echantillons de cerveaux <i>post mortem</i>	99
1.2. Procédures biochimiques pour tissu humain	100
1.3. Immunohistofluorescence sur tissu humain	100
2. <i>Expériences réalisées sur les modèles murins de tauopathies</i>	101
2.1. Modèles murins utilisés	101
2.1.1. Génération d'un modèle inductible du A _{2A} R (lignée TRE-A _{2A} R)	101
2.1.2. Modèle murin de surexpression neuronale et astrocytaire du A _{2A} R	102
2.1.3. Modèle murin de pathologie tau (THY-Tau22)	105
2.1.4. Modèle murin de pathologie amyloïde (APPsw/PS1dE9)	106
2.1.5. Stratégie de croisements	106
2.1.1. Injections stéréotaxiques	107
2.2. Analyses comportementales	109
2.2.1. Le test d'actimétrie	109
2.2.2. Le test du labyrinthe en croix surélevé	109
2.2.1. Le test du labyrinthe en Y	110
2.2.2. Le labyrinthe de Barnes	110
2.3. Euthanasie des souris	111
2.4. Analyses biochimiques	112
2.4.1. Préparation des homogénats, dosage protéique et immuno-empreinte	112
2.4.2. Electrophorèse bidimensionnelle	113
2.4.3. ELISA	115
2.5. Analyses protéomiques	115
2.5.1. Digestion protéique	115
2.5.2. Analyse par spectromètre de masse NanoLC-MS/MS	116
2.5.3. Identification des protéines et analyse	116

2.6. Analyses transcriptionnelles.....	117
2.6.1. Extraction des ARNs	117
2.6.2. Rétrotranscription et PCR quantitative (qPCR)	118
2.6.3. Séquençage de l'ARNm	119
2.7. Analyses immunohistochimiques	121
2.7.1. Immunohistochimie et immunofluorescence sur tissus de souris	121
2.7.2. Analyses des images.....	122
2.8. Electrophysiologie	125
3. Expériences réalisées sur les cultures primaires d'astrocytes	125
3.1. Cultures cellulaires d'astrocytes primaires.....	125
3.1.1. Préparation des cultures	125
3.1.2. Infections des cultures primaires d'astrocytes.....	126
3.1.3. Evaluation du métabolisme et de la cytotoxicité	126
3.2. Analyses transcriptionnelles.....	126
3.2.1. Séquençage de l'ARNm	126
3.2.2. Analyses du séquençage de l'ARNm	127
3.2.3. Rétrotranscription et PCR quantitative (qPCR)	128
3.3. Analyses biochimiques par immuno-empreinte.....	128
3.4. Analyses par immunofluorescence.....	129
4. Analyses statistiques.....	130
RESULTATS	131
PARTIE I : SUREXPRESSION NEURONALE DU RECEPTEUR A_{2A} DANS UN MODELE DE TAUOPATHIE	131
1. Expression du A _{2A} R chez les patients atteints de FTL D-tau (MAPT P301L).....	131
2. Caractérisation d'un modèle murin de surexpression neuronale du A _{2A} R.....	133
3. Evaluation comportementale des souris Tau/A _{2A} R _{Neur}	136
4. Evaluation de la pathologie tau dans les souris Tau/A _{2A} R _{Neur}	139
5. Evaluation transcriptionnelle des souris Tau/A _{2A} R _{Neur}	143
6. Evaluation microgliale dans l'hippocampe des souris Tau/A _{2A} R _{Neur}	145
7. Evaluation de C1q et de l'intégrité synaptique des souris Tau/A _{2A} R _{Neur}	147
8. Expression de C1q et A _{2A} R dans trois tauopathies primaires	152
9. Conclusion	153
PARTIE II : SUREXPRESSION NEURONALE DU RECEPTEUR A_{2A} DANS UN MODELE D'AMYLOÏDOGENESE	154
1. Caractérisation de l'expression du A _{2A} R par approche AAV.....	154
2. Evaluation comportementale des souris APP/PS1/A _{2A} R _{Neur}	156
3. Evaluation biochimique d'Aβ dans les souris APP/PS1/A _{2A} R _{Neur}	158
4. Evaluation de la neuroinflammation des souris APP/PS1/A _{2A} R _{Neur}	159
5. Evaluation protéomique et transcriptionnelle des souris APP/PS1/A _{2A} R _{Neur}	160
6. Conclusion	160

PARTIE III : SUREXPRESSION ASTROCYTAIRE DU A_{2A} DANS UN MODELE <i>IN VITRO</i>.....	163
1. <i>Caractérisation de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R</i>	163
2. <i>Evaluation transcriptomique de la surexpression astocytaire du A_{2A}R</i>	166
3. <i>Evaluation des gènes dérégulés par la surexpression astocytaire du A_{2A}R</i>	169
4. <i>Evaluation du blocage des A_{2A}R astrocytaires surexprimés</i>	171
5. <i>Conclusion</i>	172
PARTIE IV : SUREXPRESSION ASTROCYTAIRE DU A_{2A} DANS UN MODELE DE TAUOPATHIE	173
1. <i>Caractérisation de la surexpression astrocytaire dans un modèle murin</i>	173
2. <i>Evaluation comportementale</i>	174
3. <i>Evaluation biochimique</i>	176
4. <i>Evaluation de la neuroinflammation associée à tau</i>	178
5. <i>Conclusion</i>	180
DISCUSSION.....	181
1. <i>Expression du A_{2A}R dans la maladie d'Alzheimer</i>	181
2. <i>Impact astrocytaire et neuronale du A_{2A}R dans la maladie d'Alzheimer</i>	181
3. <i>A_{2A}R et fonction synaptique</i>	183
4. <i>A_{2A}R et pathologie tau</i>	184
5. <i>A_{2A}R et pathologie amyloïde</i>	185
6. <i>A_{2A}R neuronal et C1q</i>	186
7. <i>A_{2A}R astrocytaire et neuro-inflammation</i>	188
8. <i>Conclusion</i>	189
BIBLIOGRAPHIE	191
ANNEXES.....	253

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Vue d'artiste de l'origine de la vie sur Terre.	25
Figure 2 : Emil Fischer.....	26
Figure 3 : Les principales purines.	27
Figure 4 : Nucléosides et nucléotides.....	28
Figure 5 : Les bases puriques des acides nucléiques.....	28
Figure 6 : Structure de l'acétyl-coenzyme A (ACoA), du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) et de la S-adenosyl-L-homocystéine (SAH).	30
Figure 7 : Voies de production et de dégradation de l'adénosine.	32
Figure 8 : Les récepteurs purinergiques.	36
Figure 9 : Les voies de signalisation du récepteur A ₁	40
Figure 10 : Les voies de signalisation du récepteur A _{2A}	41
Figure 11 : Les voies de signalisation du récepteur A _{2B} (Borea et al., 2018).....	42
Figure 12 : Les voies de signalisation du récepteur A ₃ (Borea et al., 2018).....	43
Figure 13 : Niveaux d'expression génique des récepteurs adenosinergiques dans le cerveau.	45
Figure 14 : Les mécanismes de plasticité synaptiques	48
Figure 15 : Les différents types d'astrocytes chez l'Homme.	51
Figure 16 : Structure de l'inflammasome NLRP3.	54
Figure 17 : Fonctions du A ₁ R et A _{2A} R au niveau cellulaire dans le SNC.	55
Figure 18 : Rôle des récepteurs A ₁ et A _{2A} au niveau synaptique en condition basale.	56
Figure 19 : Rôle des récepteurs A ₁ et A _{2A} au niveau synaptique lors d'une stimulation synaptique.	58
Figure 20 : Rôle des récepteurs A ₁ et A _{2A} au niveau synaptique lors d'un stress tissulaire.	59
Figure 21 : Les circuits directs et indirects des ganglions de la base.	64
Figure 22 : Atteinte des circuits des ganglions de la base dans la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson.....	67
Figure 23 Structure de l'APP humain	70
Figure 24 Les principales voies de clivage de l'APP.	72
Figure 25 Processus d'agrégation du peptide Aβ.....	74
Figure 26 Gène, structure et sites de phosphorylation de la protéine tau.	75
Figure 27 : Processus d'agrégation de tau.	77
Figure 28 : Fonctions physiologiques et pathologiques de la protéine tau.....	80
Figure 29 : Lésions histologiques des taupathies.	82
Figure 30 : Cellules gliales en contexte physiologique et lors de la neuroinflammation.	87
Figure 31 : Structure de la caféine et effets biologiques.	90
Figure 32 : Adénosine et caféine interagissant avec le récepteur A _{2A}	90
Figure 33 : Effet de la protéine tTA neuronale sur l'intégrité de l'hippocampe des souris CaMKII-tTA.	103
Figure 34 : Effet de la doxycycline périnatale sur la neuroinflammation hippocampique induite par le LPS chez la souris adulte.	104
Figure 35 : Nouveau modèle de surexpression conditionnelle des A _{2A} Rs.	105

LISTE DES FIGURES

Figure 36 Le modèle murin THY-Tau22.	105
Figure 37 : Le modèle murin APP ^{sw} /PS1dE9.	106
Figure 38 : Plan de croisements des souris Tau/A _{2A} R ^{Astr} et Tau/A _{2A} R ^{Neur}	107
Figure 39 : Structure du crâne de souris. Le bregma est utilisé comme repère pour les injections stéréotaxiques.	109
Figure 40 Tests comportementaux utilisés.	111
Figure 41 : Principaux anticorps anti-tau utilisés.	115
Figure 42 : Exemple de quantification par seuil de marquage (MC1).	123
Figure 43 : L'expression du A _{2A} R est augmentée dans le cortex temporal des patients atteints de dégénérescence lobaire fronto-temporale (FTLD-tau) associée à une mutation P301L du gène de tau, <i>MAPT</i>	132
Figure 44 : Caractérisation de la surexpression du A _{2A} R dans le modèle transgénique conditionnel CaMKII-tTA/TRE-A _{2A} R.	134
Figure 45 : Caractérisation de la spécificité cellulaire du A _{2A} R neuronal surexprimé dans le modèle de souris doubles transgéniques CaMKII-tTA/TRE-A _{2A} R.	135
Figure 46 : Caractérisation de l'activité du A _{2A} R surexprimé.	136
Figure 47 : La surexpression neuronale du A _{2A} R favorise les déficits de mémoire spatiale dans les souris transgénique THY-Tau22.	138
Figure 48 : Localisation cellulaire de la tau humaine et du A _{2A} R surexprimés dans les souris Tau/A _{2A} R ^{Neur}	139
Figure 49 : Evaluation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau dans les souris Tau/A _{2A} R ^{Neur}	141
Figure 50 : Evaluation des kinases et phosphatases dans les souris Tau/A _{2A} R ^{Neur}	142
Figure 51 : Impact de la surexpression neuronale du A _{2A} R sur la dégénération des neurones cholinergiques du septum médian.	142
Figure 52 : Séquençage de l'ARNm chez les souris WT, A _{2A} R ^{Neur} , Tau et Tau/A _{2A} R ^{Neur} à l'âge de 6 mois.	143
Figure 53 : Annotation fonctionnelle (GO term) et analyse des regroupements de gènes (cluster)	144
Figure 54 : La surexpression neuronale des A _{2A} Rs favorise l'activation d'une signature transcriptomique microgliale particulière dans l'hippocampe des souris Tau.	146
Figure 55 : Neuroinflammation classique des souris Tau.	147
Figure 56 : Les 3 sous-unités de C1q ainsi que Trem2 sont augmentés chez les souris THY-Tau22 à partir de 9 mois et cet effet est aboli lorsque le A _{2A} R est bloqué.	148
Figure 57 : La surexpression neuronale du A _{2A} R dans les souris Tau est associée à une augmentation de C1q et à une atrophie de l'hippocampe	149
Figure 58 : La surexpression neuronale du A _{2A} R dans les souris Tau est associée à une perte synaptique	151
Figure 59 : Augmentation de C1q dans le cortex temporal des patients avec une dégénérescence lobaire fronto-temporale avec mutation <i>MAPT</i> P301L (FTLD-tau).....	152
Figure 60 : Augmentation de l'expression de <i>ADORA2A</i> , <i>CIQ</i> et <i>TREM2</i> dans le cortex frontal de deux tauopathies primaires sporadiques : la démence corticobasale (CBD) et la maladie de Pick (« Pick »).....	153
Figure 61 : Caractérisation de la surexpression du A _{2A} R induite par un virus adéno-associé (AAV).....	155
Figure 62 : La surexpression neuronale du A _{2A} R favorise les déficits de mémoire spatiale dans les souris transgénique APP ^{sw} /PS1dE9.....	157

LISTE DES TABLEAUX

Figure 63 : Analyse de la production et de l'agrégation des peptides amyloïdes A β dans les souris APP/TRE/A _{2A} R _{Neur}	158
Figure 64 : Evaluation de marqueurs inflammatoires classiquement retrouvés augmentés dans les souris APPsw/PS1dE9 par PCR quantitative.....	159
Figure 65 : Evaluation de l'expression des gènes microgliaux impliqués dans le modèle Tau/A _{2A} R _{Neur} par PCR quantitative.....	160
Figure 66 : Analyse protéomique et transcriptomique des souris APP/PS1 et APP/PS1/A _{2A} R _{Neur}	161
Figure 67 : L'analyse protéomique révèle que les souris APP/PS1/A _{2A} R _{Neur} présente une diminution des niveaux de protéines impliqués au niveau synaptique.....	162
Figure 68 : Caractérisation des cultures primaires d'astrocytes.....	164
Figure 69 : Caractérisation de la surexpression du A _{2A} R en culture primaire d'astrocytes.....	165
Figure 70 : La surexpression du A _{2A} R _{Astr} induit une large dysrégulation transcriptionnelle.....	166
Figure 71 Les processus biologiques associés au A _{2A} R _{Astr}	168
Figure 72 : La surexpression du A _{2A} R astrocytaire induit l'augmentation d'expression de gènes liés au vieillissement et à la réactivité astrocytaire.s.....	169
Figure 73 : Le A _{2A} R astrocytaire dérégule l'expression des gènes associés à la sécrétion et l'inflammation.....	170
Figure 74 : Le blocage du A _{2A} R par le SCH 58261 restaure les niveaux d'expression d'Il1b, Slc7a11 et Vim dans les A _{2A} R _{Astr}	171
Figure 75 : Caractérisation de la surexpression du A _{2A} R dans le modèle transgénique conditionnel GFAP-tTA/TRE-A _{2A} R.....	174
Figure 76 La surexpression astrocytaire du A _{2A} R favorise les déficits de mémoire spatiale dans les souris transgéniques THY-Tau22.....	175
Figure 77 Evaluation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau dans les souris Tau/A _{2A} R _{Astr}	177
Figure 78. Evaluation de l'expression des kinases dans les souris Tau/A _{2A} R _{Astr}	178
Figure 79 : Neuro-inflammation classique des souris Tau.....	179
Figure 80 : Hypothèse de la dysrégulation du A _{2A} R au cours du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer.....	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des récepteurs P2X.....	37
Tableau 2 : Principales caractéristiques des récepteurs P2Y.....	38
Tableau 3 : Classification et lésions histologiques des principales tauopathies.....	82
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés.....	114
Tableau 5 : Liste des primers et sondes utilisés dans les études <i>in vivo</i>	119
Tableau 6 : Liste des primers utilisés dans l'étude <i>in vitro</i>	128

INTRODUCTION

Préambule : les origines de la vie sur Terre

A l'échelle cosmique, la Terre est relativement jeune. En effet, tandis que l'Univers est âgé de 13,8 milliards d'années, notre planète, la Terre, est apparue « seulement » il y a 4,54 milliards d'années (Dalrymple, 1994). Même si l'apparition de la vie semble être un événement particulièrement rare étant donné que la Terre est la seule planète connue à en avoir, il est surprenant de constater que la vie sur celle-ci se soit si rapidement développée. En effet, elle serait apparue il y a 4,1 milliards d'années (Wilde *et al.*, 2001; Abramov & Mojzsis, 2009; Bell *et al.*, 2015). Cela est d'autant plus remarquable que durant cette période, correspondant à l'éon¹ Hadéen, deux événements aux dimensions bibliques ont eu lieu. Le premier étant la collision de la planète Théia avec notre Terre il y a 4,5 milliards d'années, ce qui a créé la lune et façonné notre planète telle que nous la connaissons aujourd'hui (Canup & Asphaug, 2001; Asphaug, 2014). Le deuxième événement est un bombardement intensif de météores qui ont percuté la Terre il y a 3,9 milliards d'années et a duré entre 20 et 200 millions d'années (Kring & Cohen, 2002). C'est au milieu de ce chaos que les constituants cellulaires de base seraient apparus (Figure 1), et notamment une famille de molécules essentielles au fonctionnement et à la communication cellulaire : les purines.



Figure 1 : Vue d'artiste de l'origine de la vie sur Terre. L'évolution de la vie depuis l'éon Hadéen à gauche jusqu'à l'Homme à droite. A noter la présence des molécules de bases dans les océans primitifs, notamment les purines (*Illustration exposée au centre de recherche de la NASA, © 2019 Bausch Design*).

¹ Un éon représente une période de temps à l'échelle des temps géologique.

Chapitre I : Le système purinergique

1. Les purines : définition et structure

1.1. Découverte des purines

Les purines ont été découvertes au 19^{ème} siècle grâce aux travaux du chimiste allemand Emil Fischer (1852-1919) (Figure 2). Ce dernier travaillait sur l'acide urique, découvert cent ans plus tôt par Carl Wilhelm Scheele (Scheele, 1776), puis synthétisé en 1828 par Friedrich Wöhler (Wöhler, 1828). La réduction de l'acide urique par Emil Fischer lui a permis d'en isoler la structure de base, nommée purine (Fischer, 1898). L'origine de ce terme « purine » provient de l'expression latine « *purum uricum acidum* » (signifiant « acide urique pur ») dont Emil Fischer mélangea les mots *purum* (pur) et *uricum* (urine) (l'acide urique étant particulièrement concentré dans les urines) (Fischer, 1884). Ces travaux sur les purines et les sucres lui vaudront, quelques années plus tard, le prix Nobel de Chimie en 1902.



Figure 2 : Emil Fischer

1.2. Structure et classification des purines

Les purines sont les hétérocycles les plus fréquents dans la nature (Rosemeyer, 2004). Leur structure de base correspond à la molécule homonyme, la **purine (1)** (Figure 3A), qui est un hétérocycle composé d'un noyau pyrimidine (**1a**) fusionné à un noyau imidazole (**1b**). Cette molécule de base n'est toutefois pas retrouvée dans la nature, contrairement aux autres membres de cette famille.

L'ajout d'un groupement cétone (=O) sur cette molécule de base donne naissance à l'**hypoxanthine** (6-oxypurine) (**2**) (Figure 3B). Un deuxième groupement cétone génère la **xanthine** (2,6-oxypurine) (**3**), et enfin, un troisième groupement cétone permet de former l'**acide urique** (2,6,8-oxypurine) (**4**).

En repartant de la structure de base, l'ajout d'un groupement amine (-NH₂) forme l'**adénine** (6-aminopurine) (**5**) (Figure 3C). L'ajout d'un groupement cétone et d'un groupement amine à la purine génère une **guanine** (2-amino-6-oxypurine) (**6**).

Il existe des dérivés de la xanthine chez les plantes possédant un ou plusieurs groupements méthyl (-CH₃): la **théophylline** (1,3-diméthylxanthine), la **théobromine** (3,7-diméthylxanthine) et la **caféine** (1,3,7-triméthylxanthine) (Figure 3D). La caféine est

particulièrement présente dans les grains de caféier et les feuilles de théier. Elle est en grande partie responsable des effets stimulants des boissons caféinées, ce qui en fait la molécule psychoactive la plus consommée dans le monde.

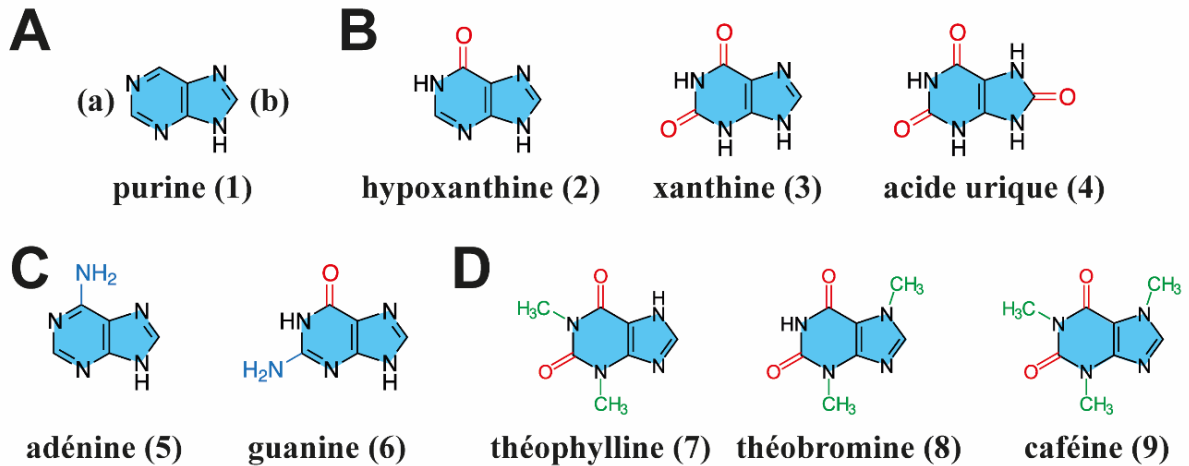


Figure 3 : Les principales purines. (A) La purine (1), qui correspond à la molécule la plus simple, est constituée d'un noyau pyrimidine (a) fusionné à un noyau imidazole (b). (B) L'ajout d'un ou plusieurs groupements cétones (=O) forme l'hypoxanthine (2) (un groupement), la xanthine (3) (deux groupements) et l'acide urique (4) (trois groupements). (C) L'ajout d'un groupement amine (-NH₂) forme l'adénine (5) et la guanine (6) (qui présente également un groupement cétonique). (D) La xanthine est également di- ou tri-méthylées chez les plantes (groupement -CH₃) formant la théophylline (7), la théobromine (8) et la caféine (9).

1.3. Nucléosides et nucléotides purinergiques

Les purines contribuent également à générer des nucléosides et nucléotides, essentiels aux processus biologiques du vivant, comme nous le verrons par la suite. L'ajout d'un sucre à une base nucléique via une liaison N-glycosidique permet de générer de nouvelles molécules : les **nucléosides** (Figure 4A). Particulièrement, on retrouve les cinq nucléobases constitutives de l'ARN et de l'ADN, à savoir deux purines : l'adénine et la guanine (Figure 4B), et trois pyrimidines : la thymine, l'uracile et la cytosine. Leurs liaisons avec un ribose permettent de générer cinq ribonucléosides qui sont incorporés dans l'ARN, respectivement l'adénosine, la guanosine, la ribothymidine, l'uridine et la cytidine. Par ailleurs, la perte d'un groupement hydroxyl (-OH) sur le ribose permet la formation de désoxyribonucléosides qui sont eux incorporés dans l'ADN, respectivement la désoxyadénosine, la désoxyguanosine, la désoxythymidine, la désoxyuridine et la désoxycytidine.

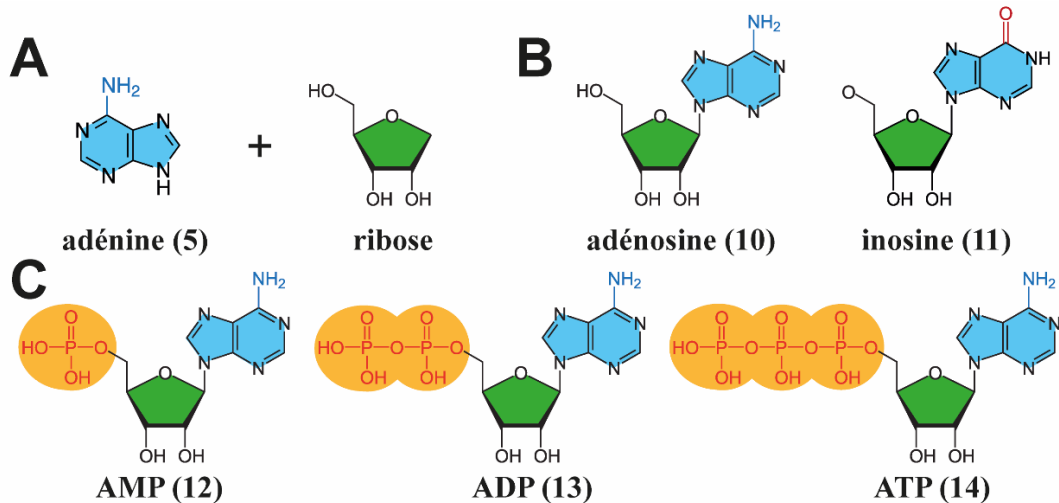


Figure 4 : Nucléosides et nucléotides. La liaison d'une adénine et d'un ribose (A) donne un nucléoside, tels que l'adénosine et son métabolite, l'inosine (B). La phosphorylation d'un nucléoside résulte en la formation d'un nucléotide. (C) Les dérivés nucléotides de l'adénosine sont l'adénosine monophosphate (AMP), diphosphate (ADP) et triphosphate (ATP).

Les ribonucléosides et désoxyribonucléosides peuvent être phosphorylés par l'action de kinases, permettant la formation de **nucléotides** (Figure 4C et Figure 5), qui sont les éléments de base de l'ARN et de l'ADN. Ainsi, l'adénosine, la guanosine, la ribothymidine, l'uridine et la cytidine vont donner les formes phosphorylées suivantes : l'AMP, la GMP, la TMP, l'UMP et la CMP, ainsi que leurs homologues sous formes de désoxyribose : la dAMP, la dGMP, la dTMP, la dUMP et la dCMP (Figure 5).

Au niveau de l'ARN, on retrouve l'AMP, la GMP, l'UMP et la CMP. L'AMP et l'UMP s'unissent via deux liaisons hydrogènes et la GMP et la CMP s'unissent via trois liaisons hydrogènes. Dans l'ADN, la dAMP s'unit avec la TMP, et la dCMP avec la dGMP. Le dUMP n'est pas incorporé dans l'ADN en conditions normales.

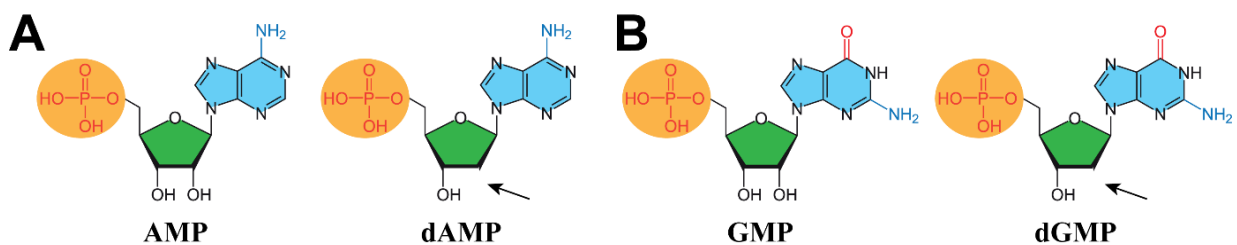


Figure 5 : Les bases puriques des acides nucléiques. Les bases AMP (A) et GMP (B) font partis des quatre bases constituant l'ARN. Les bases dAMP et dGMP sont elles incluses dans l'ADN.

En définitive, les purines sont des molécules présentes à tous les niveaux cellulaires, de la gestion énergétique (ATP) à la constitution même du code génétique (AMP, GMP). Les concentrations de l'adénosine et de ses dérivés sont finement régulées afin de maintenir un fonctionnement optimal de la cellule.

2. L'adénosine et ses dérivés

2.1. Concentrations de l'adénosine et ses dérivés à l'échelle cellulaire

Les différents niveaux d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'adénosine et de leurs dérivés sont finement régulés au sein des cellules. En premier lieu, l'ATP qui est la ressource énergétique de prédilection de la cellule, est très concentré dans le milieu intracellulaire, de 5 à 10 mM (Schwiebert & Zsembery, 2003), contrairement à ses formes déphosphorylées, l'ADP et l'AMP, de l'ordre du μM au nM selon les études (Hawkins *et al.*, 1973; Roth & Weiner, 1991). L'adénosine, quant à elle, est à une concentration physiologique de 25 à 250 nM (Kroll *et al.*, 1992; Deussen *et al.*, 1999; Dunwiddie & Masino, 2001).

Les dérivés de l'ATP ont une fonction de senseur métabolique. Ainsi, lors d'une demande énergétique ou d'un stress cellulaire comme une hypoxie, les niveaux d'ATP vont baisser au profit de l'ADP (Headrick & Willis, 1990). L'augmentation d'ADP va tout d'abord activer l'adénylate kinase, qui converti 2 ADP en ATP + AMP (Ballard, 1970). Cette augmentation d'AMP consécutive va être dégradée en adénosine (Bak & Ingwall, 1998; Decking *et al.*, 1997; Headrick & Willis, 1990) aboutissant à une augmentation d'adénosine intracellulaire. De cette manière, les quantités d'adénosine peuvent atteindre jusqu'à 30 μM dans le cerveau et le coeur (Latini *et al.*, 1999; Manthei *et al.*, 1998) et 100 μM dans la moelle épinière (McAdoo *et al.*, 2000).

2.2. Production de l'ATP

La production d'ATP au niveau cellulaire se fait via différentes voies, à savoir la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (pour revue voir Bonora *et al.*, 2012). Lors de la glycolyse, le glucose, principal métabolite énergétique de la cellule, est converti en pyruvate générant 2 ATP. Le pyruvate est ensuite converti en acétyl-coenzyme A (un dérivé de l'adénosine, Figure 6A) et orienté vers le cycle de Krebs, permettant la production de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite, un autre dérivé de l'adénosine, structure en Figure 6B) qui sera utilisé dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Le NADH permet de créer un gradient de protons à travers la membrane

interne de la mitochondrie afin de produire massivement de l'ATP via phosphorylation oxydative, grâce à l'ATP synthase mitochondriale. L'acétyl-coenzyme A (ACoA) peut également être produite par du catabolisme des lipides et des protides.

Dans le milieu extracellulaire, l'ATP a une demi-vie relativement courte de 20 secondes due à la présence d'enzymes, les ectonucléotidases, capables de l'hydrolyser très rapidement (Picher *et al.*, 2004). Ainsi, la concentration en ATP au niveau extracellulaire est de 1 à 10 nM, soit un million de fois moins concentrée qu'au niveau intracellulaire (Melani *et al.*, 2005). En condition de stress cellulaire, comme lors d'une ischémie ou d'une épilepsie, l'ATP extracellulaire augmente de 1,5 à 10 fois son niveau de base, mais elle est rapidement dégradée par les ectonucléotidases (Lietsche *et al.*, 2016; Melani *et al.*, 2005).

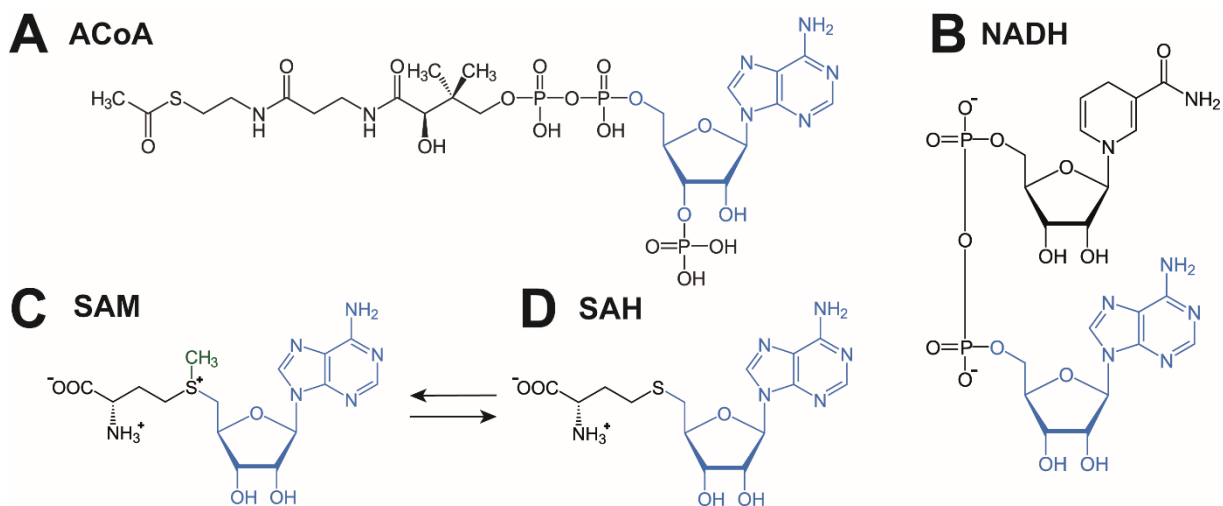


Figure 6 : Structure de l'acétyl-coenzyme A (ACoA), du nicotinamide adénine dinucléotide réduct (NADH), de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) et de la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH). L'ACoA (A), le NADH (B), le SAM (C) et le SAH (D) contiennent une adénosine (indiquée en bleu) dans leur structure. Le SAM est le principal donneur de méthyle (groupement méthyle indiqué en vert) dans la cellule (C).

2.3. Production de l'adénosine

La production intracellulaire d'adénosine repose sur trois enzymes : la 5'-nucléotidase (ou nucléotide phosphate) sélective de l'AMP, la 5'-ectonucléotidase et la S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) hydroxylase (Figure 7).

La 5'-nucléotidase sélective de l'AMP est responsable de la production de 70% de l'adénosine dans le cœur (Darvish *et al.*, 1996; Garvey & Prus, 1999), permettant d'hydrolyser l'AMP en adénosine et de libérer un groupement phosphate. Cette enzyme est régulée positivement par l'ADP, qui augmente lors d'une demande énergétique (associée à

une diminution de l'ATP et donc une augmentation du ratio ATP/ADP) ou liée à une hypoxie empêchant la production d'ATP par les mitochondries.

L'ectonucléotidase CD73, aussi appelé *ecto-5'-nucléotidase* (NT5E), est une glycoprotéine membranaire qui, comme l'enzyme précédente, va hydrolyser l'AMP. Ces deux enzymes, aux rôles similaires, sont le résultat d'une évolution convergente car elles se sont développées séparément (Misumi *et al.*, 1990; Sala-Newby *et al.*, 1999). Mais contrairement à la 5'-nucléotidase, l'activité de CD73 est inhibée par l'ATP et l'ADP. Il faut noter que l'hydrolyse de l'ATP en AMP est assurée par l'ectonucléotidase CD39, aussi appelée *ecto-nucléotide triphosphate diphosphohydrolase 1* (ENTDP1) (Zimmermann, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012). Ces ectonucléotidases sont très performantes et convertissent l'ATP en adénosine en 50 ms (Dunwiddie *et al.*, 1997).

La troisième voie de production de l'adénosine est liée à l'hydrolyse de la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH, structure en Figure 6D) par la SAH hydrolase. Cette enzyme est essentielle au maintien du niveau de base d'adénosine dans le cœur, mais son rôle dans le cerveau semble toutefois bien plus limité (Dulla *et al.*, 2005; Pascual, 2005; Frenguelli *et al.*, 2007). Cette enzyme présente la particularité d'être réversible, et son action vers la production d'adénosine ou de SAH va dépendre de la concentration intracellulaire d'adénosine et d'homocystéine (Loncar *et al.*, 1997). Cependant, celle-ci est principalement orientée vers l'hydrolyse de la SAH car l'adénosine et l'homocystéine sont toutes deux rapidement métabolisées (Deussen *et al.*, 1988). Il est intéressant de noter que le précurseur de la SAH, la S-adénosyl-L-méthionine (SAM, structure en Figure 6C), est le principal donneur de méthyl de l'organisme. A ce titre, cette voie est impliquée dans les processus épigénétiques de méthylation de l'ADN, permettant la répression des gènes (Cantoni, 1952).

Au niveau extracellulaire, la quantité d'adénosine dépend, d'une part, de l'hydrolyse successive de l'ATP par les ectonucléotidases CD39 et CD73, et d'autre part, de son transport à travers la membrane plasmique.

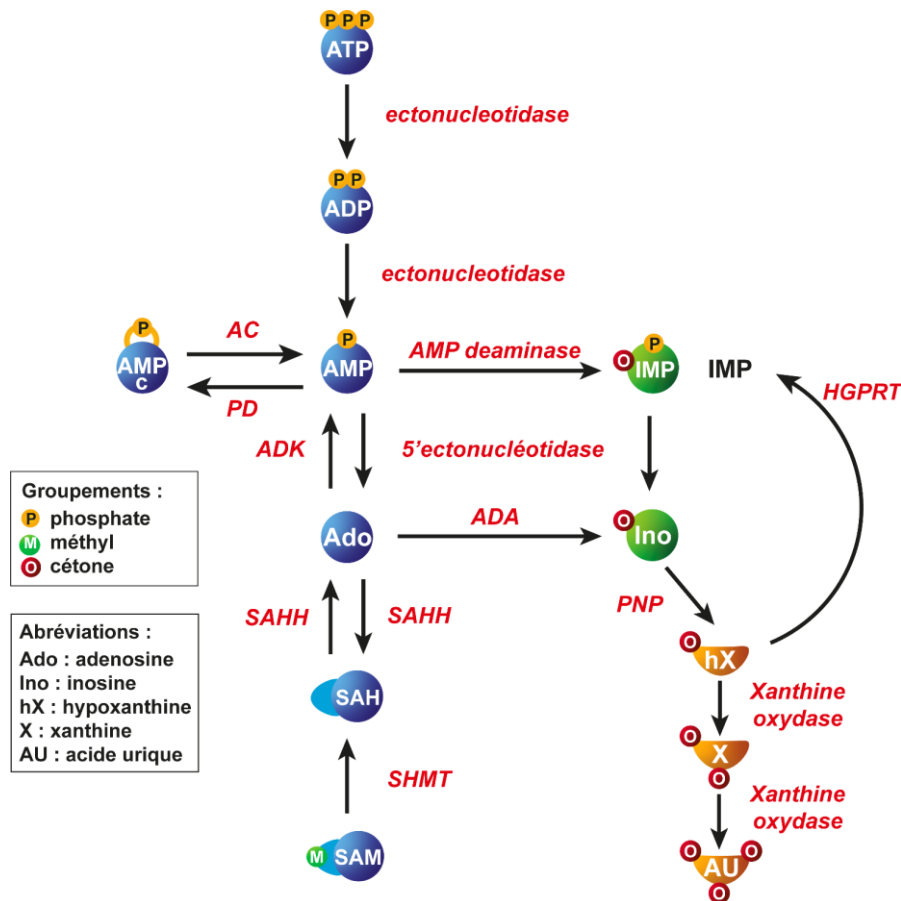


Figure 7 : Voies de production et de dégradation de l'adénosine. L'adénosine est produite à partir de l'hydrolyse de l'AMP par les 5'-nucléotidases ou par l'hydrolyse de la SAH. Les deux enzymes responsables de la dégradation de l'adénosine sont l'adénosine kinase et l'adénosine déaminase, produisant respectivement de l'AMP et de l'inosine. L'inosine est orientée vers la voie des xanthines aboutissant à la formation d'acide urique et à son élimination dans les urines. 5'-ntase : 5'-*nucleotidase*, PD : *ectophosphodiesterase*, ADA : adénosine déaminase, SAHH : SAH hydrolase, SHMT : *S-adenosyl methyl transférase*, PNP : *purine nucleoside phosphorylase*, ADK : adénosine kinase. Inspiré de Schmidt *et al.*, 2007.

2.4. Transport de l'adénosine

L'adénosine est transportée entre les compartiments intra- et extracellulaires via deux types de transporteurs : les transporteurs équilibratifs de nucléotides (appartenant à la famille des « *solute carrier family 28* ») et les transporteurs concentratifs de nucléotides (de la famille des « *solute carrier family 29* »).

Les transporteurs de nucléosides équilibratifs (ENT1, 2, 3, 4) sont bidirectionnels, indépendants de tout gradient de sodium et permettent une diffusion suivant le gradient de part et d'autre de la membrane (Baldwin *et al.*, 2004; Molina-Arcas *et al.*, 2009). Ils sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme. Seuls les ENT1 et 2 permettent le transport optimal de l'adénosine.

Les transporteurs de nucléosides concentratifs (CNT 2, 3) sont unidirectionnels, permettant uniquement le transport de l'adénosine du milieu extracellulaire vers le cytosol. Le transport d'une adénosine se fait contre un gradient de concentration et nécessite un ou deux sodium, respectivement pour CNT2 et 3 (Gray *et al.*, 2004). Ces transporteurs sont particulièrement enrichis dans le cerveau et les cellules immunitaires.

2.5. Dégradation de l'adénosine

Les deux enzymes responsables de la dégradation de l'adénosine sont l'adénosine kinase et l'adénosine déaminase (Figure 7). L'adénosine kinase permet la conversion de l'adénosine en AMP, avec une constante de Michaelis-Menten² (K_m) de 2 μM (Borea *et al.*, 2016). L'adénosine déaminase va elle convertir l'adénosine en inosine (cf. Figure 4B page 28), avec un K_m de 17-45 μM (Borea *et al.*, 2016). Ainsi, des travaux ont montré que le blocage de l'adénosine kinase induisait une augmentation d'adénosine, contrairement au blocage de l'adénosine déaminase qui n'a aucun effet (Kowaluk & Jarvis, 2000). Ainsi, l'adénosine kinase est la principale enzyme de dégradation de l'adénosine en conditions physiologiques. Toutefois, une déficience de l'adénosine déaminase est associée à une immunodéficiência (Bradford *et al.*, 2017) mais également à certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Khermesh *et al.*, 2016; Alonso-Andrés *et al.*, 2018).

Comme nous avons pu le voir, les purines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, à la fois dans le métabolisme (ATP/ADP), l'encodage génétique (bases A et G), la méthylation de l'ADN (SAM) et le stress oxydant (NADH). Toutefois, leur rôle ne s'arrête pas là. En effet, ces molécules ont également un rôle dans la signalisation.

3. La signalisation purinergique

3.1. Les purines comme molécules de signalisation

L'adénosine et ses dérivés phosphorylés présentent des fonctions de signalisation. Originellement, l'ATP a sans doute été un signal de danger pour les cellules. Nous avons vu précédemment que l'ATP est très concentrée dans les cellules et jusqu'à un million de fois moins dans le milieu extracellulaire. Ainsi, toute augmentation extracellulaire d'ATP témoigne d'une rupture de l'intégrité cellulaire, ce qui suggère l'existence d'un danger (Burnstock, 1996; Hoyle, 2011). Par la suite, ce système de communication basé sur les

² La constante de Michaelis-Menten (K_m) correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale (V_{max}).

purines a gagné en complexité via l'apparition (1) d'enzymes de dégradation de l'ATP, (2) de mécanismes contrôlés de libération des purines, et (3) des récepteurs aux purines.

En premier lieu, l'apparition d'enzymes de dégradation, rapides et efficaces, ont permis de mieux contrôler les niveaux d'ATP extracellulaire. Ces deux enzymes sont CD39 et CD73, que nous avons déjà vu (Zimmermann, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012). Ce sont probablement les premiers composants du système purinergique à être apparus, étant retrouvées dans les bactéries et les protozoaires (Zimmermann *et al.*, 2012).

En deuxième lieu, l'ATP a pu être libéré de façon contrôlée via des canaux perméables à l'ATP tels que la connexine-43 (Cx43) et la pannexine-1 (Panx1) (Chever *et al.*, 2014; Lopatář *et al.*, 2015; Orellana *et al.*, 2015; Montero & Orellana, 2015) et plus tard, chez les organismes pluricellulaires (Zimmermann, 1994; Burnstock, 2007; Imura *et al.*, 2013). L'adénosine est également présente dans les vésicules de sécrétion (Corti *et al.*, 2013), contrairement à ce qui a longtemps été pensé (Zimmermann, 1994).

En dernier lieu, les récepteurs aux purines sont apparus de manière séquentielle au cours de l'évolution. Les tous premiers à être apparus ont été les récepteurs ionotropiques sensibles à l'ATP, les P2X. Ils étaient probablement déjà présents chez le dernier ancêtre commun universel (LUCA), étant présents à la fois chez les protozoaires, champignons, plantes et les animaux primitifs. (Chiu *et al.*, 1999; Fountain & Burnstock, 2009; Burnstock & Verkhratsky, 2012). Dans un second temps sont apparus d'autres types de récepteurs, les récepteurs couplés aux protéines G. Les plus anciens d'entre eux étant probablement les récepteurs sensibles à l'AMP cyclique (AMPc) (CAR1-4), car retrouvés chez les procaryotes et les eucaryotes (Kim & Wu, 1996; Liebmann *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2007). Puis sont apparus chez les eucaryotes les récepteurs à l'adénosine P1, présents dans les anémones de mer, les insectes ou encore les étoiles de mer (Mustard, 2014). Bien plus tard sont apparus les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à l'ATP et ses dérivés, les P2Y, dont les premiers membres ont été retrouvés chez les requins et les raies (Hoyle, 2011). Très récemment, un autre type de récepteur a été mis en évidence, sensible à l'adénine, les P0 (ou AdeR), uniquement décrits chez la souris et le hamster à l'heure actuelle (Knospe *et al.*, 2013; Thimm *et al.*, 2013).

3.2. Mise en évidence de la signalisation des purines

Cela fait plus de 90 ans que la signalisation par les purines, en particulier les dérivés de l'adénine, tels que l'adénosine et l'ATP, ont été mis en évidence. Les premiers travaux ont montré que l'ATP était capable d'induire des phénomènes biologiques au niveau cellulaire tels que l'induction d'un ralentissement du rythme cardiaque et d'une vasodilatation du

muscle utérin et intestinal (Drury & Szent-Györgyi, 1929; Gillespie, 1934). Le rôle direct de l'ATP au niveau de la jonction neuromusculaire a été lui mis en évidence à partir de 1944 par Buchthal et Kahlson (Buchthal & Folkow, 1944), ainsi que son rôle modulateur sur l'action de l'acétylcholine (ACh) (Buchthal & Folkow, 1948; Buchthal & Kahlson, 1944). Son rôle a par la suite été exploré au niveau du système nerveux central (SNC), d'abord montré dans la moelle épinière (Buchthal *et al.*, 1947) puis au niveau du cerveau (Feldberg & Sherwood, 1954; Finger *et al.*, 2005). Il a été montré que l'adénosine et l'ATP induisaient des effets au niveau cérébral, provoquant une ataxie et une somnolence mais pouvait également exciter les neurones (Babskii & Malkiman, 1950; Galindo *et al.*, 1967). Par la suite, différents travaux ont suggéré que l'ATP serait un neurotransmetteur à part entière. Les travaux de Holton et Holton ont ainsi montré que l'ATP pouvait activer les nerfs (Holton & Holton, 1954; Holton, 1959). Le concept de « nerfs purinergiques » a été pour la première fois employé par Geoffrey Burnstock en 1972 (Burnstock, 1972), stipulant qu'une population de neurones avait pour neurotransmetteur principal l'ATP. Bien que ce concept ait été largement critiqué pendant une vingtaine d'années, il est maintenant admis que l'ATP est en mesure d'agir comme un neurotransmetteur.

3.3. Découverte des récepteur purinergiques

Les récepteurs aux purines, aussi appelés récepteurs purinergiques, ont été mis en évidence en 1976 (Burnstock, 1976), mettant en avant l'existence potentielle de deux types de récepteurs, reconnaissant l'ATP ou l'adénosine, et également couplés à une signalisation dépendante de l'AMPc. Deux ans plus tard, Burnstock propose de distinguer les récepteurs en deux classes : les P1 sensibles aux nucléosides (adénosine) et les P2 sensibles aux nucléotides (ATP/ADP) (Figure 8) (Burnstock, 1978).

A cette même période, deux types de récepteurs P1 ont été identifiés : A1 (inhibant l'adénylate cyclase) et A2 (activant l'adénylate cyclase, permettant la production d'AMPc) (van Calcar *et al.*, 1979; Londos *et al.*, 1980). Tous deux sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), à sept domaines transmembranaires. Concernant les P2, deux formes ont été identifiées à partir de 1985, les P2X et P2Y, basées sur leur affinité aux analogues de l'ATP et aux antagonistes des P2 (Burnstock & Kennedy, 1985). Par la suite, d'autres types de récepteurs P2 ont été proposés (P2T, P2Z, P2U) (Gordon, 1986; Seifert & Schultz, 1989; O'Connor *et al.*, 1991) avant qu'une classification uniformisée ne soit réalisée. De cette façon, les récepteurs P2 ont été classés en deux groupes : les P2X qui sont ionotropiques (c'est-à-dire qui laissent passer un flux d'ion à travers la membrane suite à leur activation par

un ligand) et les P2Y qui sont métabotropiques (à la façon des récepteurs P1, ce sont des RCPG) (Abbracchio & Burnstock, 1994). Cette classification est basée sur les découvertes de l'époque à la fois sur la transduction des récepteurs (Dubyak, 1991) mais aussi sur la structure des récepteurs (Lustig *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1993; Brake *et al.*, 1994; Valera *et al.*, 1994).

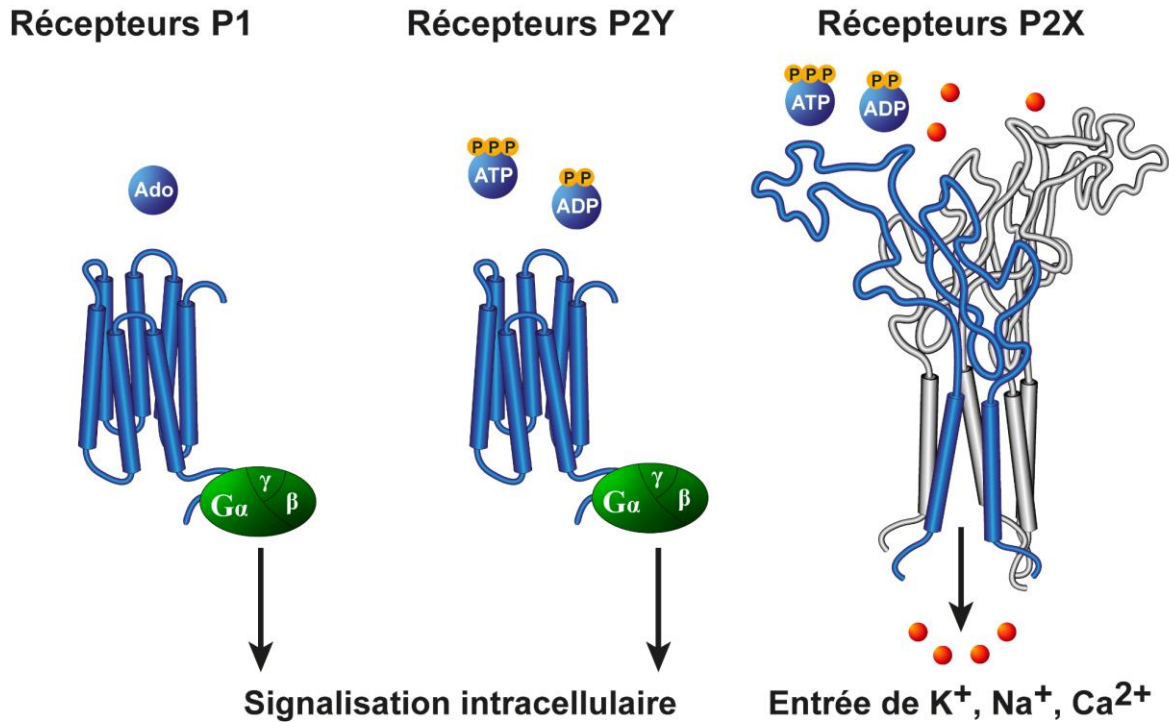


Figure 8 : Les récepteurs purinergiques. Les récepteurs P1 sont sensibles aux nucléosides comme l'adénosine. Les récepteurs P2 sont, eux, sensibles aux nucléotides tels que l'ADP et l'ATP mais également les dérivés UDP et UTP. Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropiques et les récepteurs P2Y et P1 sont des récepteurs métabotropiques.

3.4. Les récepteur P2 sensibles aux nucléotides

L'ATP possède des fonctions de modulation de la neurotransmission, de la neuroinflammation, de l'activité des cellules gliales, agissant à la fois comme une molécule de communication paracrine ou comme neurotransmetteurs. Ces différentes fonctions mettent en jeu les récepteurs P2. A l'heure actuelle, 15 récepteurs P2 sont connus (Coddou *et al.*, 2011; von Kügelgen & Hoffmann, 2016), dont sept P2X (récepteurs ionotropiques) et huit P2Y (récepteurs métabotropiques).

3.4.1. Les récepteurs ionotropiques P2X

Les récepteurs P2X sont constitués de deux domaines transmembranaires, d'une queue C-terminale (C-ter, COOH) et N-terminale (N-ter, NH₂) ainsi que d'une longue boucle extracellulaire. Cette dernière contient 10 résidus cystéines conservés permettant la formation de ponts disulfures. Les P2X possèdent une forte homologie de séquences d'acides aminés entre eux, allant de 30 à 50% (Ormond *et al.*, 2006; Jarvis & Khakh, 2009; Habermacher *et al.*, 2016). Ces récepteurs forment des trimères constituant un canal. Ces trimères peuvent s'établir sous forme d'hétérotrimères (incluant différents récepteurs P2X) ou d'homodimères (un seul type de P2X) (Tableau 1) (North, 2002; Saul *et al.*, 2013). Ces canaux sont perméables à différents ions tels que le calcium Ca²⁺ et le chlorure Cl⁻. (Samways *et al.*, 2014).

On dénombre à l'heure actuelle sept récepteurs ionotropiques P2X : P2X1-7. La composition des trimères de P2X module l'affinité du canal pour le Ca²⁺ et le Na⁺ (Egan & Khakh, 2004). Lorsque le nucléotide se lie aux P2X, l'activation de ces récepteurs induit une dépolarisation de la membrane liée à l'augmentation de Na⁺ et de Ca²⁺ libre cytosolique. Ces mécanismes influent sur la propagation des potentiels d'action mais également sur les fonctions sensibles au calcium telles que la prolifération, la sécrétion, la migration et l'activité synaptique via plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme les voies PKC, MAPK et AKT (Heo & Han, 2006; Neary *et al.*, 2008; Tsao *et al.*, 2013; Tang & Illes, 2017).

Récepteur	Acides aminés	Partenaires (homo/hétéromère)	Affinité à l'ATP	Désensibilisation
P2X1	399	P2X1, P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5	Forte	Rapide
P2X2	471	P2X1/2, P2X2, P2X2/3, P2X2/6	Faible	Lente
P2X3	397	P2X2/3, P2X3	Forte	Rapide
P2X4	388	P2X4, P2X1/4, P2X4/6, P2X4/7	Faible	Lente
P2X5	422	P2X1/5, P2X5	Forte	Lente
P2X6	441	P2X6, P2X2/6, P2X4/6	Inactif	Pas de courant
P2X7	595	P2X7, P2X4/7	Faible	Non

Tableau 1 : Principales caractéristiques des récepteurs P2X (North, 2002; Saul *et al.*, 2013).

3.4.2. Les récepteurs métabotropiques P2Y

Au même titre que les récepteurs P1, les P2Y sont des RCPG, avec une extrémité N-ter extracellulaire et C-ter intracellulaire. Cette dernière est également riche en séquences consensus phosphorylables. Huit sous-types ont été identifiés, basés sur leur affinité pour les nucléotides : P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 et P2XY11-14. A noter que les récepteurs P2Y5, P2Y9 et P2Y10 ont été retirés de la nomenclature, ne présentant pas assez d'affinité pour leurs ligands et n'ayant pas une signalisation suffisamment établie ; ils sont ainsi redevenus des récepteurs orphelins. Ces récepteurs présentent une homologie de séquence moins importante entre eux, variant de 19 à 55% (von Kügelgen & Hoffmann, 2016). Au niveau pharmacologique, ils sont très différents, avec des sous-types particulièrement sensibles aux nucléotides diphosphates. Leurs structures et propriétés pharmacologiques sont différentes, avec des tailles de 328 à 421 acides aminés, couplés aux protéines $G_{q/11}$ et/ou $G_{i/o}$, et présentant également une affinité différentielle pour les nucléotides (Tableau 2) (von Kügelgen & Hoffmann, 2016).

Leur activation contribue également à une myriade de fonctions parmi lesquelles la prolifération, la phagocytose, la sécrétion et l'adhésion cellulaire via des voies intracellulaires telles la voie $G_q/PLC/IP3$, MAPK, ERK et CREB (Erb & Weisman, 2012; Van Kolen & Slegers, 2006; Langfelder *et al.*, 2015; Illes & Rubini, 2017).

Récepteur	Acides aminés	Agoniste principal	Protéine G
P2Y1	373	ADP	$G_{q/11}$
P2Y2	377	ATP, UTP	$G_{q/11}$
P2Y4	365	UTP, (ATP antagoniste)	$G_{q/11}$, G_i
P2Y6	328/421	UTP	$G_{q/11}$
P2Y11	371/374	ATP	$G_{q/11}$, G_s
P2Y12	342	ADP, (ATP antagoniste)	G_i
P2Y13	354	ADP	G_i
P2Y14	338	UDP	$G_{i/o}$

Tableau 2 : Principales caractéristiques des récepteurs P2Y (von Kügelgen & Hoffmann, 2016)

3.5. Les récepteurs P1 sensibles aux nucléosides

Les récepteurs à l'adénosine (ou P1) sont des RCPG dont chacun des sept domaines transmembranaires est composé de 21 à 28 acides aminés. Ils possèdent une extrémité N-ter extracellulaire, une extrémité C-ter intracellulaire, trois boucles extracellulaires (EC1, 2, 3) et trois boucles intracellulaires (IC1, 2, 3). Il faut noter que les boucles EC2 et IC3 sont particulièrement longues. Les sept domaines forment une poche permettant la liaison à l'adénosine et autres molécules.

Il existe quatre récepteurs adénoenergiques : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ (Fredholm *et al.*, 2001a). On retrouve les récepteurs adénoenergiques chez tous les eucaryotes, sous différentes formes (pour revue voir Burnstock & Verkhratsky, 2012). Ces récepteurs divergent par leurs fonctionnalités, leurs voies d'activations et leurs propriétés pharmacologiques (pour revue voir Borea *et al.*, 2018). Ils possèdent des séquences relativement homologues entre eux, les plus proches étant le A₁R et A₃R ainsi que A_{2A}R et A_{2B}R avec 46,5% d'homologie, et les plus distants sont le A_{2A}R et A₃R avec 32% d'homologie (Borea *et al.*, 2018). En activant ses récepteurs cibles, l'adénosine module physiologiquement de nombreuses fonctions centrales telles que le cycle veille-sommeil, l'activité motrice et certaines fonctions cognitives (anxiété, dépression, mémoire) (Dias *et al.*, 2013).

3.5.1. Les récepteur adénoenergique A₁ (A₁R)

Le récepteur A₁ (A₁R) est issu du gène *ADORA1* de 77 kilobases (Kb), cloné pour la première fois en 1991 dans l'hippocampe (Libert *et al.*, 1991; Mahan *et al.*, 1991; Reppert *et al.*, 1991; Libert *et al.*, 1992; Townsend-Nicholson & Shine, 1992) et localisé sur le chromosome 1q32.1 (chez l'homme) et 1 (chez la souris) (Townsend-Nicholson *et al.*, 1995). Il est composé de deux exons interrompus par un seul intron, codant une protéine unique de 326 acides aminés (chez l'homme et la souris). Il est exprimé dans tous les tissus mais particulièrement dans le cerveau (Reppert *et al.*, 1991). L'affinité de ce récepteur pour l'adénosine est de 1-10 nM (Borea *et al.*, 2018). Le A₁R est couplé à une protéine G inhibitrice (Gi/o), qui inhibe l'adénylate cyclase et réduit ainsi la production d'AMP cyclique (AMPC) (Figure 9). En outre, ce récepteur interagit avec d'autres partenaires comme la phospholipase C, augmentant ainsi l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et les niveaux de calcium Ca²⁺ intracellulaire permettant l'activation de protéines kinases calcium-dépendantes (PKC) et aux protéines liant le calcium. Il est également en mesure de favoriser la sortie de potassium via différents types de canaux potassiques, tout en réduisant les canaux calciques de type Q, P et N (Borea *et al.*, 2018).

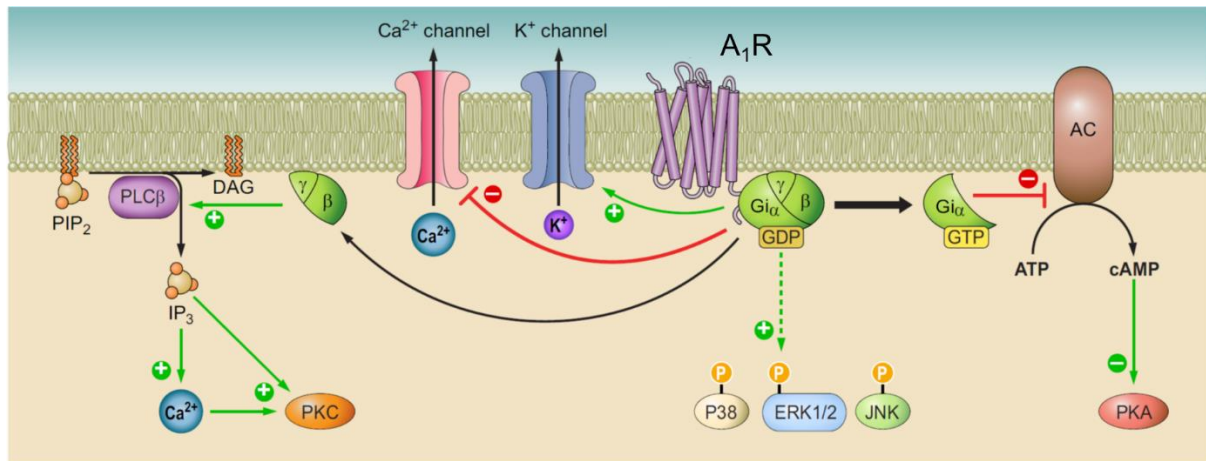


Figure 9 : Les voies de signalisation du récepteur A_1 . Le A_1R via son couplage à une protéine Gi inhibitrice va réguler négativement l'adénylate cyclase. Il va également activer la phospholipase C afin d'augmenter le Ca^{2+} cytosolique et d'activer la voie PKC. Il permet également la sortie de potassium et va activer différentes voies de signalisation intracellulaire (Borea *et al.*, 2018).

3.5.2. Récepteur adénoenergique A_{2A} ($A_{2A}R$)

Le récepteur A_{2A} ($A_{2A}R$) est issu du gène *ADORA2A* de 24 Kb, cloné pour la première fois en 1990 (Maenhaut *et al.*, 1990; Furlong *et al.*, 1992) et localisé sur le chromosome 22q11.23 (chez l'homme) et 10 (chez la souris) (Le *et al.*, 1996; MacCollin *et al.*, 1994; Peterfreund *et al.*, 1996). Il est composé de deux exons interrompus par un seul intron, codant une protéine A_{2A} de 410 ou de 409 acides aminés, respectivement chez l'Homme ou la souris. Il est également ubiquitaire (Fredholm *et al.*, 2007) mais particulièrement exprimé dans les ganglions de la base (notamment dans le striatum, composé du noyau accumbens, du putamen et du noyau caudé) et a des niveaux plus faibles dans les autres régions du cerveau comme l'hippocampe et le néocortex (Cunha *et al.*, 1994; Jarvis & Williams, 1989; Kirk & Richardson, 1995).

L'affinité de ce récepteur pour l'adénosine est de 30 nM (Borea *et al.*, 2018). Le $A_{2A}R$ est couplé à la protéine G activatrice G_s (et G_{olf} dans le striatum), favorisant l'activation de l'adénylate cyclase et ainsi la production d'AMPc (Figure 10). L'AMPc est un messenger intracellulaire activant la protéine kinase A (PKA) et la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB). Ces protéines permettent, respectivement, de phosphoryler d'autres protéines afin d'en moduler la fonction et de réguler l'expression génique. Le $A_{2A}R$ peut également interagir via son extrémité C-ter intracellulaire particulièrement longue avec d'autres partenaires comme les MAPK, les récepteurs D2, l' α -actinine, la β -arrestine, ARNO (ADP-ribosylation factor nucleotide site opener), USP4 (ubiquitin-specific protease), TRAX

(translin-associated protein X) et la calmoduline (Borea *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2015a; Tossavainen *et al.*, 2015). Cette séquence C-ter est très conservée parmi les mammifères.

Le A_{2A}R forme des hétéromères avec plusieurs autres RCPGs, modifiant ainsi leur fonctionnement, tels que des récepteurs couplés à des protéines G comme les récepteurs dopaminergiques D2 (Hillion *et al.*, 2002), les récepteurs A₁ (Ciruela *et al.*, 2006), les récepteurs A_{2B} (Moriyama & Sitkovsky, 2010), les récepteurs cannabinoïdes CB1R (Carriba *et al.*, 2007), les récepteurs métabotropiques au glutamate mGLUR5 (Ferré *et al.*, 2002), mais également à des enzymes comme l'adénosine déaminase (Gracia *et al.*, 2011) et l'ectonucléotidase CD73 (Augusto *et al.*, 2013). Par ailleurs, de nombreux travaux ont également établi un rôle entre le A_{2A}R et le BDNF (brain derived-neurotrophic factor ; le principal facteurs neurotrophique du cerveau) (Lee & Chao, 2001), que ce soit au niveau de sa disponibilité (Tebano *et al.*, 2008) et de son effet sur le renforcement de la plasticité synaptique (Diogenes *et al.*, 2014; Vaz *et al.*, 2015). Nous reverrons l'effet neuromodulateur du A_{2A}R plus en détail dans le chapitre suivant.

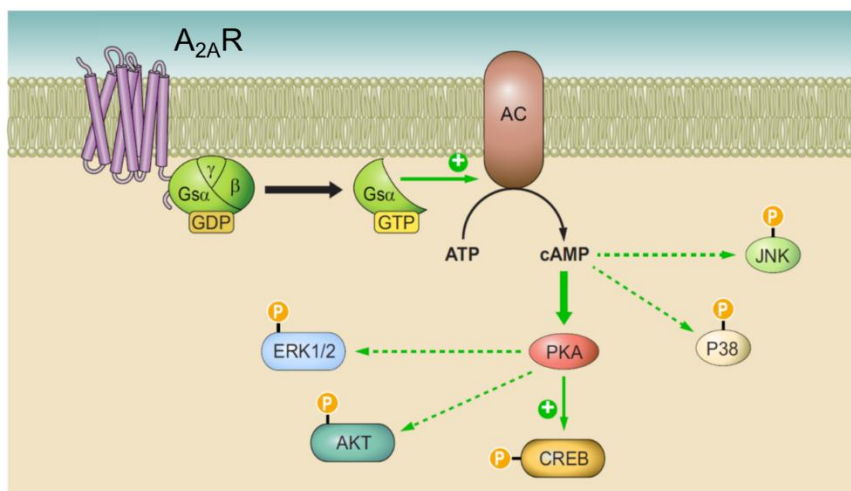


Figure 10 : Les voies de signalisation du récepteur A_{2A}. Le A_{2A}R via son couplage à une protéine Gs activatrice va activer l'adénylate cyclase. Cela va lui permettre, via la production d'AMPc, d'activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaire telles que PKA/CREB ou p38 MAPK (Borea *et al.*, 2018).

3.5.3. Récepteur adénoenergique A_{2B} (A_{2BR})

Le récepteur A_{2B} est codé par le gène *ADORA2B* de 31 Kb, également cloné en 1992 (Pierce *et al.*, 1992) et localisé sur le chromosome 17p11.2-12 (humain) et 11 (souris). Il est composé de deux exons interrompus par un seul intron, codant une protéine unique de 328 ou 332 acides aminés, respectivement chez l'homme et la souris. Il est fortement exprimé dans

de nombreux tissus périphériques comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et immunitaires – mais moins dans le cerveau. Parmi les quatre récepteurs à l'adénosine, le $A_{2B}R$ est celui qui possède la plus faible affinité pour l'adénosine, de l'ordre de $1 \mu M$. Ce récepteur est couplé aux protéines Gs et Gq, cette dernière étant couplée à la phospholipase C, une enzyme capable de convertir le PIP₂ (phosphatidylinositol biphosphate) en IP₃ (inositol triphosphate) et diacylglycérol (DAG) (Figure 11). L'IP₃ permet la libération de Ca²⁺ du reticulum endoplasmique et le DAG active la protéine kinase C (PKC).

Ce récepteur est peu caractérisé puisque sa faible affinité pour son agoniste lui suggère un rôle mineur en condition physiologique. Cependant, dans un contexte pathologique, à la manière du $A_{2A}R$, l'expression du $A_{2B}R$ augmente, notamment durant les phénomènes d'hypoxie et d'inflammation (Vecchio *et al.*, 2019). Cette surexpression serait liée au facteur de transcription HIF-1 α , un régulateur de la réponse à l'hypoxie (Kong *et al.*, 2006; Eckle *et al.*, 2014).

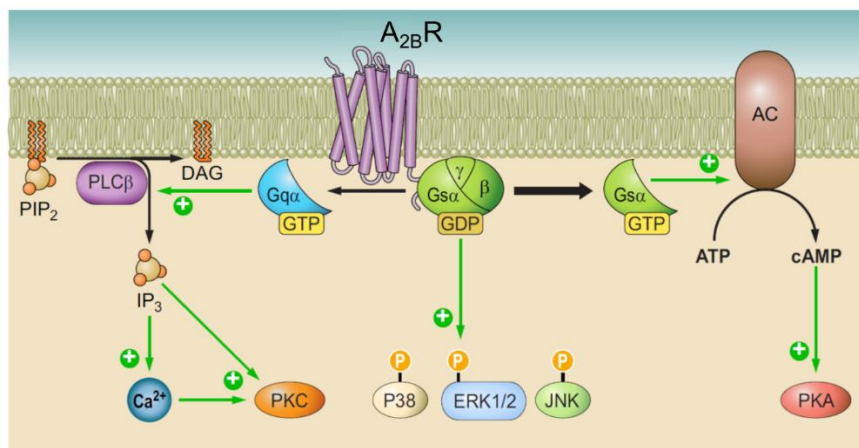


Figure 11 : Les voies de signalisation du récepteur A_{2B} (Borea *et al.*, 2018). Le $A_{2B}R$ via son couplage à une protéine Gs excitatrice va activer l'adénylate cyclase lui permettant d'activer différentes voies de signalisation intracellulaire. Il est également capable d'activer la phospholipase C afin d'augmenter le Ca²⁺ cytosolique et d'activer la voie PKC (Borea *et al.*, 2018).

3.5.4. Récepteur adénosinergique A_3 (A_3R)

Le récepteur A_3 est codé par le gène ADORA3 de 4,3 Kb, cloné en 1992 (Sajjadi & Firestein, 1993; Salvatore *et al.*, 1993) et localisé sur le chromosome 1p13.2 (chez l'homme) et 3 (chez la souris) (Monitto *et al.*, 1995; Murrison *et al.*, 1995). Il est composé de deux exons interrompus par un seul intron, codant une protéine unique de 318 ou 320 acides aminés, respectivement chez l'homme et chez la souris. Il est exprimé dans de nombreux

tissus mais particulièrement dans les cellules inflammatoires et cancéreuses, ainsi que dans les testicules, la moelle épinière, les glandes surrénales, la substance noire et la rate (Salvatore *et al.*, 1993). L'affinité de ce récepteur pour l'adénosine est de 100 nM (Borea *et al.*, 2018). Ce récepteur est couplé à la protéine Gi et Gq (Figure 12). Tout comme pour le A_{2B}R, peu de données sont disponibles sur le A₃R. Cependant, de nombreuses études lui attribuent un rôle dans la neuroinflammation (Jacobson *et al.*, 2018) et dans le cancer (Cohen & Fishman, 2019).

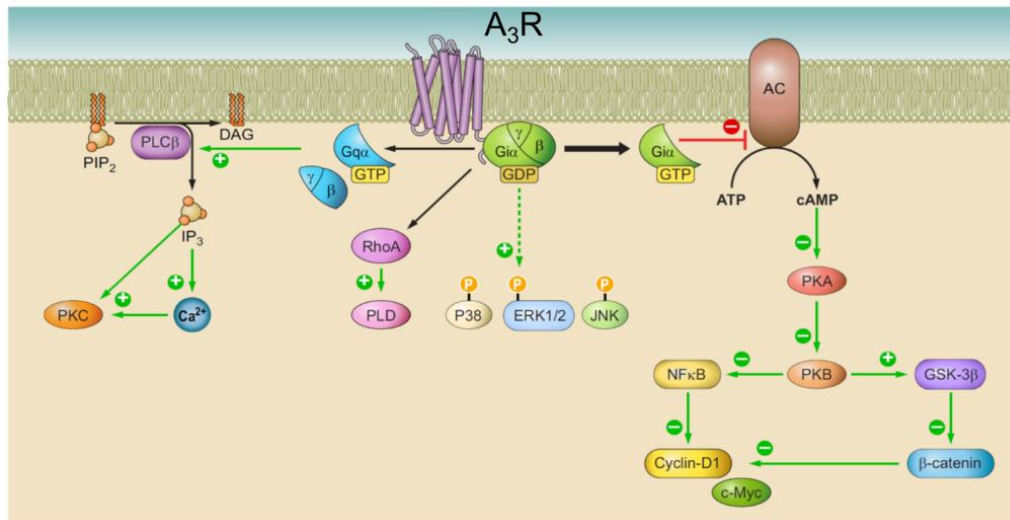


Figure 12 : Les voies de signalisation du récepteur A₃ (Borea *et al.*, 2018). Le A₃R via son couplage à une protéine Gi inhibitrice et Gq va réguler négativement l'adénylate cyclase. Il va également activer la phospholipase C afin d'augmenter le Ca²⁺ cytosolique et d'activer la voie PKC. Il permet également la sortie de potassium et va activer différentes voies de signalisation intracellulaire (Borea *et al.*, 2018).

Nous l'avons vu au cours de ce chapitre, la signalisation purinergique joue un rôle important dans le fonctionnement des cellules. Plus particulièrement, les dérivés de l'adénine au niveau extracellulaire sont capables d'influer sur les fonctions cellulaires via leurs récepteurs. A ce titre, les récepteurs adénosinergiques³ sont exprimés de façon ubiquitaire mais sont particulièrement enrichis dans le cerveau. Dans le prochain chapitre nous tenterons de comprendre leur rôle modulateur des fonctions cérébrales et également leurs implications dans diverses pathologies.

³ Sensible à l'adénosine

Chapitre II : Rôle de l'adénosine dans le cerveau

L'adénosine joue un rôle neuromodulateur très important dans le cerveau, que nous allons voir au cours de chapitre. En effet, les différents récepteurs adénoenergiques, décrits précédemment, sont particulièrement exprimés dans le cerveau ce qui a donné lieu à de nombreux travaux de recherche. Leurs implications, à la fois dans les phénomènes physiologiques comme le cycle veille-sommeil ou la plasticité synaptique, mais également dans les conditions pathologiques telles que les maladies neurodégénératives en font des cibles de choix pour de nouvelles pistes thérapeutiques.

1. Expression au niveau central des récepteurs à l'adénosine

Les quatre récepteurs à l'adénosine, A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ sont exprimés dans le SNC humain et murin, avec toutefois une certaine disparité. En effet, les sous-types A₁R et A_{2A}R sont de loin les plus représentés, contrairement au A_{2B}R et A₃R qui sont très peu exprimés au niveau central et de ce fait moins étudiés (Figure 13).

Le A₁R est le plus exprimé au niveau cérébral, particulièrement enrichi dans les régions du néocortex, du cervelet, de la moelle épinière et de l'hippocampe, une région très importante pour la mémoire (Figure 13) (Goodman & Snyder, 1982). Le A_{2A}R est lui très enrichi dans la région du striatum et dans le bulbe olfactif (Bruns *et al.*, 1986). Toutefois, ce récepteur est également présent en quantité plus modeste dans les autres régions du cerveau tels que le néocortex ou l'hippocampe (Sebastião & Ribeiro, 1992; Cunha *et al.*, 1994). Le A_{2B}R est très peu exprimé dans le cerveau (Dixon *et al.*, 1996) et le A₃R est uniquement présent dans l'hippocampe et la moelle épinière, en quantité relativement faible (Fredholm *et al.*, 2001b).

Additionnellement à leurs localisations tissulaires, les récepteurs adénoenergiques sont également retrouvés à la surface d'une multitude de types cellulaires dans le cerveau, tels que les neurones et les cellules gliales, leur conférant des fonctions multiples et variées.

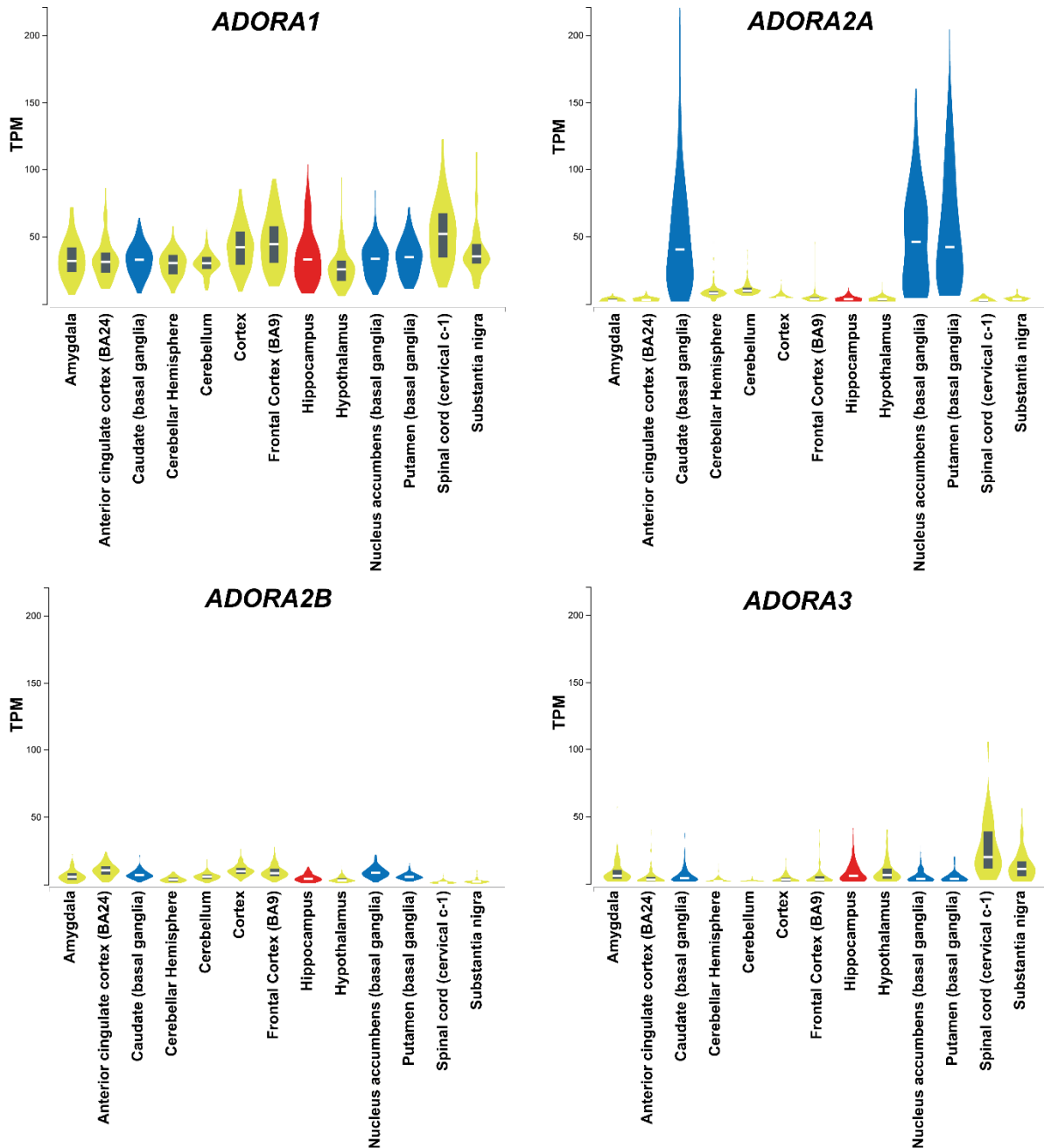


Figure 13 : Niveaux d'expression génique des récepteurs adénosinergiques dans le cerveau. Le A_1R (*ADORA1*) est très exprimé dans le cerveau (en **vert clair**), notamment l'hippocampe (en **rouge**). Le $A_{2A}R$ (*ADORA2A*) est retrouvé particulièrement enrichi dans les ganglions de la base (striatum, en **bleu**). Les $A_{2B}R$ (*ADORA2B*) et A_3R (*ADORA3*) ne sont retrouvés qu'à des niveaux très faibles. Données issues de la base de données Genotype-Tissue Expression (GTEx) (<https://gtexportal.org/home/>). TPM : *transcripts per million*.

2. Récepteurs adénergiques et neurones

2.1. Principales fonctions des neurones

Les neurones sont des cellules spécialisées dans la transmission d'information à travers le cerveau. Ils sont organisés sous formes de réseaux responsables de toutes les fonctions cognitives telles que l'apprentissage d'une tâche, l'encodage d'un souvenir ou encore la reconnaissance d'un visage. Classiquement, les neurones ont une structure polarisée bien particulière : un corps cellulaire, de nombreuses dendrites et un axone. Les dendrites sont des ramifications issues du corps cellulaires qui portent les épines dendritiques, lesquelles constituent la partie post-synaptique des synapses, recevant des informations d'autres neurones. De son côté, l'axone est un prolongement unique, même s'il peut y en avoir plusieurs dans certains neurones, pouvant mesurer jusqu'à 25 mètres chez le rorqual bleu, qui est le plus grand animal à l'heure actuelle (Smith, 2009). L'axone s'arborise à son extrémité pour se connecter à d'autres neurones via la formation des extrémités présynaptiques. Classiquement, on distingue deux types de neurones, les excitateurs et les inhibiteurs, c'est-à-dire qui vont déclencher ou réprimer l'activation de l'extrémité postsynaptique et la transmission du signal. Cette caractéristique est liée aux neurotransmetteurs libérés par les neurones, qui vont interagir au niveau des récepteurs post-synaptiques et avoir un effet excitateur ou inhibiteur. Ainsi, la majorité des synapses, environ 90%, libère du glutamate, qui est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Parmi les 10% restants, 90% des synapses libèrent de l'acide γ -amino butyrique (GABA), qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau. Les neurones restants présentent d'autres types de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine ou la dopamine. A titre d'exemple, dans l'hippocampe, une région particulièrement impliquée dans les processus mnésiques, se trouve une couche de cellules pyramidales glutamatergiques. Ces dernières reçoivent environ 30 000 connexions excitatrices contre seulement 1700 inhibitrices (Megías *et al.*, 2001). Il existe toutefois une multitude de neurotransmetteurs qui ont des effets drastiquement différents (Wheeler *et al.*, 2015).

2.2. La plasticité synaptique

Afin que le réseau neuronal soit efficace, il doit être plastique. En d'autres termes, l'efficacité synaptique doit être en mesure de se renforcer, ou de se réduire, et cela afin d'encoder des informations précises tels que des souvenirs. Ces phénomènes sont regroupés sous le terme de plasticité synaptique (Hobbiss *et al.*, 2018). Ils ont pour la première fois été

mis en évidence lors d'une stimulation neuronale à haute fréquence, permettant aux stimulations suivantes d'induire une réponse du neurone plus importante, c'est la potentialisation à long terme (LTP pour *long term potentiation*) (Abraham *et al.*, 1994, 2002; Citri & Malenka, 2008; Lynch, 2004; Staubli & Scafidi, 1997). A l'inverse, une stimulation à basse fréquence va conduire à diminuer la réponse aux stimulations ultérieures, c'est la dépression à long terme (LTD pour *long term depotentiation*). Cette plasticité apparaît suite à des mécanismes précoces, juste après la stimulation (E-LTP pour *early*), mais également à long terme (L-LTP pour *late*). Afin de comprendre ces mécanismes, il faut introduire les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques AMPAR (récepteur à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) et NMDAR (récepteur au N-méthyl-D-aspartate). En effet, lors d'une stimulation, l'extrémité présynaptique va libérer du glutamate qui va se fixer sur les AMPAR et induire des entrées d'ions dans l'extrémité post-synaptique (Figure 14A). Ce phénomène induit un changement dans le potentiel membranaire et va se propager le long de la synapse jusqu'au corps neuronal. Lors d'une stimulation soutenue, cette dépolarisation importante va permettre aux récepteurs NMDA (NMDAR) d'être mis en jeu. En effet, le canal de ces récepteurs est, à l'état basal, bloqué par des ions magnésium Mg^{2+} , ce qui les empêche de laisser passer un flux de sodium et de calcium. Toutefois, lors d'une stimulation prolongée, les ions Mg^{2+} vont être libérés grâce aux dépolarisations, permettant un influx ionique à travers les NMDAR (Huganir & Nicoll, 2013) (Figure 14B).

L'activation de ces récepteurs va également permettre l'entrée de calcium. L'augmentation importante de Ca^{2+} favorise l'activation de kinases comme CaMKII (Figure 14C') (Silva *et al.*, 1992) alors que les faibles augmentations vont plutôt activer les phosphatases PP1 et PP2A (Figure 14C'') (Mulkey *et al.*, 1994). La phosphorylation des AMPAR et NMDAR va aboutir au renforcement de leurs localisations au niveau de la membrane plasmique, et leurs déphosphorylations va contribuer à leur internalisation (Figure 14C) (Barria *et al.*, 1997; Kameyama *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998, 2000). L'entrée de calcium par les NMDAR va également activer des facteurs de transcription qui vont pouvoir moduler l'expression de gènes clés, impliqués dans les phénomènes de L-LTP. Ces mécanismes expliquent pourquoi des heures ou des années après, une synapse est capable de garder sa potentialisation. A l'inverse, lors de la L-LTD qui va désensibiliser la membrane plasmique, les AMPAR et NMDAR vont être internalisés parallèlement à des phénomènes de répression de gènes (Jurado, 2017). Ces phénomènes, bien que maintenus durant la vie, peuvent perdre en efficacité durant le vieillissement cérébral (Burke & Barnes, 2006, 2010).

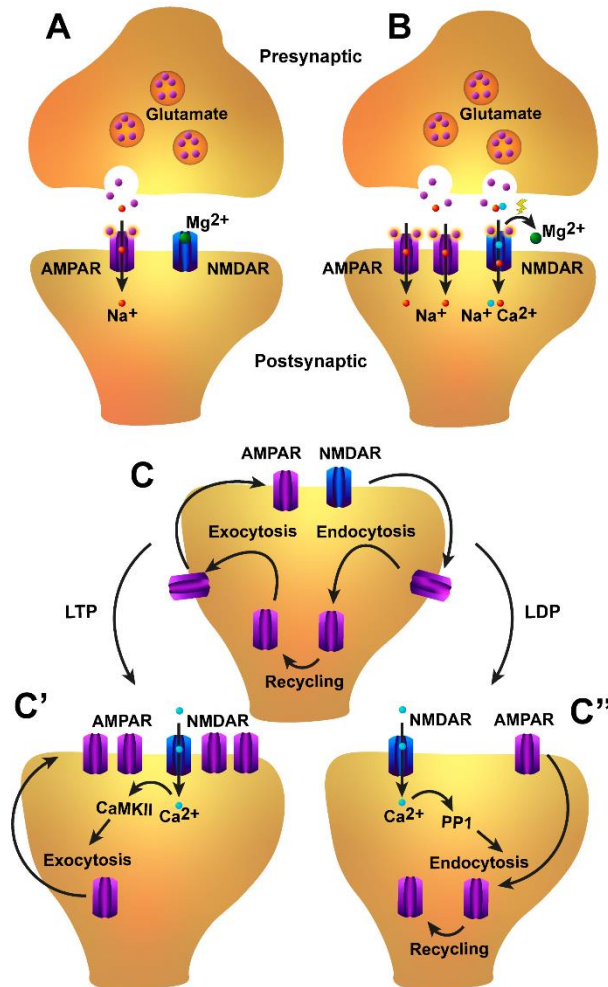


Figure 14 : Les mécanismes de plasticité synaptiques (Korte and Schmitz, 2016). (A) Lors de la libération de glutamate par l'extrémité présynaptique, celui-ci va se lier aux AMPAR. Cela va entraîner une entrée de sodium Na⁺ et créer une dépolarisation locale de la membrane. (B) Lorsqu'il y a suffisamment de glutamate, l'activation de nombreux AMPAR vont créer une dépolarisation d'intensité suffisante pour retirer le Mg²⁺ qui bloque le canal du NMDAR. Ce dernier, une fois activé, laisse passer du Na⁺ et du Ca²⁺. (C) Les récepteurs AMPAR sont soumis à un recyclage sous dépendance calcique. (C') Le Ca²⁺ entrant va activer des kinases sensibles au Ca²⁺ tel que la protéine calmoduline kinase II (CaMKII) qui va phosphoryler les AMPAR et leurs permettre d'être libérés à la membrane par exocytose et de rejoindre la synapse pour renforcer la « force » de la synapse. C'est le mécanisme de LTP. (C'') Lorsque la synapse est activée à une faible fréquence, le Ca²⁺ entrant va activer préférentiellement des phosphatases comme PP1, qui va déphosphoryler les AMPAR et favoriser leur endocytose, c'est la LTD.

2.3. Modulation de l'excitabilité neuronale par les récepteurs à l'adénosine

La fonction neuronale et synaptique des récepteurs adénergiques a été largement étudiée depuis plusieurs décennies. Cet intérêt tient compte de l'expression particulièrement importante de ces récepteurs dans les neurones du cortex et de l'hippocampe pour le A₁R et au niveau du striatum pour le A_{2A}R. Ces deux types de récepteurs sont présents à la fois au niveau pré- et post-synaptique (Rebola *et al.*, 2003). Toutefois, les A_{2A}Rs sont très enrichis au niveau du striatum, particulièrement au niveau des dendrites et des épines dendritiques (Rebola *et al.*, 2005a; Schiffmann *et al.*, 2007). Ces récepteurs sont présents dans les synapses glutamatergiques (Tetzlaff *et al.*, 1987; Rebola *et al.*, 2003, 2005b), GABAergiques (Cunha & Ribeiro, 2000; Shindou *et al.*, 2002; Rombo *et al.*, 2015) mais également dopaminergiques, cholinergiques, sérotoninergiques et adrénérgiques (Cunha, 2016).

Le ratio entre les récepteurs A₁R/A_{2A}R va moduler l'excitabilité des neurones, que ce soit en termes de libération de neurotransmetteur depuis l'extrémité présynaptique ou au niveau de l'excitabilité des récepteurs postsynaptiques. Ces phénomènes sont liés aux voies de signalisation de ces deux récepteurs, couplés à une protéine G inhibitrice pour le A₁R, qui va

inhiber les flux calciques présynaptiques, empêchant ainsi la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Dunwiddie & Masino, 2001; Dunwiddie *et al.*, 1997; Perrier *et al.*, 2019). Au contraire, le A_{2A}R favorise la libération de neurotransmetteurs directement via sa signalisation G activatrice qui va augmenter les influx de calcium (Gubitz *et al.*, 1996; Dunwiddie *et al.*, 1997; Rebola *et al.*, 2005b; Ciruela *et al.*, 2006), et indirectement via l'inhibition de la voie de signalisation du A₁R après formation d'hétérodimères A₁R/A_{2A}R (Lopes *et al.*, 2002; Ferre *et al.*, 2008). Au niveau post-synaptique, ces récepteurs sont également capables de former des hétérodimères avec d'autres types de récepteurs voir mêmes des hétérotétramères (Bonaventura *et al.*, 2015; Ferré *et al.*, 2018) et ainsi moduler leurs activités. De cette façon, le A_{2A}R est capable de se lier et d'inhiber les récepteurs inhibiteurs A₁R et cannabinoïdes (CB1R) (Carriba *et al.*, 2007). Dans le striatum, le A_{2A}R est largement décrit pour interagir avec les récepteurs inhibiteurs dopaminergiques D2 (Beggiato *et al.*, 2016). De plus, de nombreux travaux montrent que l'activation du A_{2A}R est nécessaire aux actions synaptiques de facteurs de croissance et neuropeptides tels que le BDNF (Diógenes *et al.*, 2007; Jerónimo-Santos *et al.*, 2014; Vaz *et al.*, 2015).

La synapse est une entité complexe et mettant à contribution les neurones mais également les cellules gliales. Les récepteurs adénosinergiques sont également exprimés dans ces dernières, participant à l'homéostasie cérébrale et au bon fonctionnement des neurones.

3. Récepteurs adénosinergiques et cellules gliales

Les cellules gliales ont longtemps été décrites comme des cellules de support, ne servant qu'à maintenir les neurones en place, d'où leur nom (« glue » en allemand). Néanmoins, ce concept a largement évolué. D'un rôle passif, elles sont maintenant connues pour être très actives et essentielles au fonctionnement du cerveau. Il est également intéressant de constater que les espèces ayant les cerveaux les plus développés, telles que les primates ou les cétacés, ont des cellules gliales plus nombreuses et complexes que les animaux dont le cerveau est moins développé, comme celui des rongeurs (Hawkins & Olszewski, 1957). Il existe de nombreux types et sous-types de cellules gliales, certains étant limités à quelques régions cérébrales particulières. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement aux trois types les plus représentés dans le néocortex et l'hippocampe à savoir les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules microgliales.

3.1. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses dans le cerveau, représentant de 45 à 75% de l'ensemble des cellules gliales suivant les régions cérébrales (Valério-Gomes *et al.*, 2018). La fonction la mieux décrite est celle de myéliniser les axones, consistant à former des manchons lipidiques de myéline, régulièrement espacées de zones démyélinisées, les nœuds de Ranvier. La propagation des courants ne se fait qu'au niveau des nœuds de Ranvier qui concentrent les canaux sodiques, permettant un influx bien plus rapide que dans les neurones sans myéline. La myélinisation est un phénomène dynamique, et même à l'âge adulte, les oligodendrocytes sont capables de remanier la myélinisation des axones à leur contact (Chang *et al.*, 2016). Additionnellement à ces fonctions, les oligodendrocytes sont capables d'un support métabolique des axones (Philips & Rothstein, 2017). Ils possèdent des transporteurs monocarboxylates (MCT) afin de libérer le lactate qui sera métabolisé par les neurones. Ils sont également capables d'établir des jonctions communicantes (GAP) avec les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes via l'expression de connexines (Cx) bien particulières (Cx43/26/30 pour les astrocytes, Cx36 pour les neurones et Cx32/47 pour les oligodendrocytes) (Philips & Rothstein, 2017).

3.2. Les astrocytes

Les astrocytes représentent la deuxième population la plus importante de cellules gliales, comprenant 30 à 60 % d'entre elles selon les régions (von Bartheld *et al.*, 2016). Ce sont des cellules hautement ramifiées, donnant à la cellule un aspect de buisson appelé buisson astrocytaire, permettant aux astrocytes d'interagir avec les synapses, vaisseaux et cellules alentours. Chez les mammifères sont retrouvés une multitude d'astrocytes différents tels que les astrocytes protoplasmiques de la substance grise, les astrocytes filamenteux de la substance blanche, la glie de Bergmann du cervelet, les cellules de Müller dans la rétine (Miller & Raff, 1984). Chez les primates, il existe deux types additionnels que sont les astrocytes à projections variqueuses et les astrocytes inter laminaires (Figure 15A, C-F) (Arranz & De Strooper, 2019; Vasile *et al.*, 2017). Aussi, chaque astrocyte surveille un territoire bien délimité de celui des autres astrocytes, ce qui constitue également un signe de bon fonctionnement de ces cellules (Halassa *et al.*, 2007). Les astrocytes possèdent également d'importantes modifications structurales parmi les espèces. Chez le rongeur, un astrocyte mesure 30-60 μm de diamètre, possède 3 à 4 branches principales et interagit avec jusqu'à 100 000 synapses. Les astrocytes chez l'Homme sont beaucoup plus gros, de 100 à 200 μm (soit 27 fois le volume d'un astrocyte de rat), possèdent jusqu'à 40 branches principales se

projetant dans toutes les directions et interagissant avec plus de deux millions de synapses (Figure 15B). Cette complexification des astrocytes a été suggérée comme facteur important dans le gain de cognition des espèces (Oberheim *et al.*, 2006, 2009).

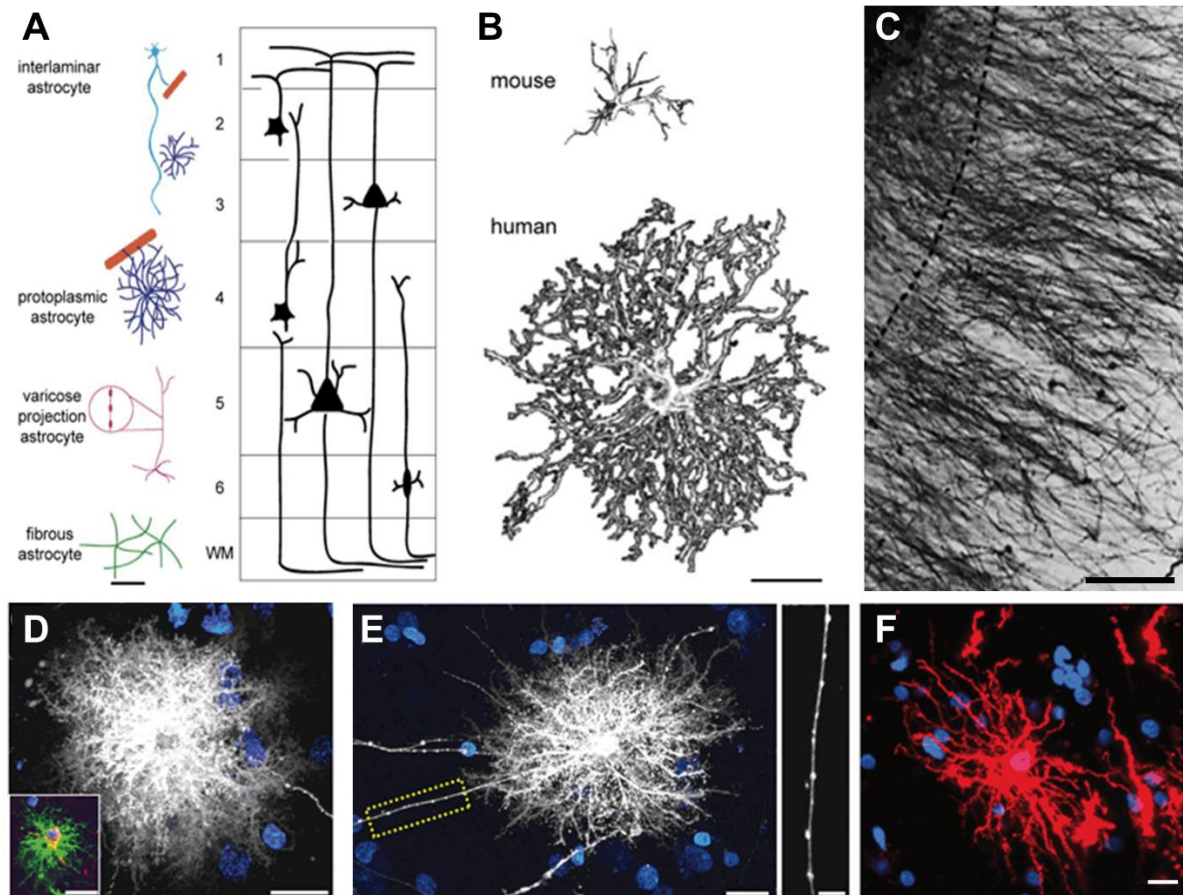


Figure 15 : Les différents types d'astrocytes chez l'Homme. (A) Les quatre types d'astrocytes principaux chez l'Homme. Echelle = 100 μ m. (B) Comparaison entre un astrocyte protoplasmique murin et humain. Echelle = 25 μ m. (C-F) Images représentatives d'astrocytes inter laminaire (C), protoplasmiques (D), à projections variqueuses (E) et fibreux (F). Echelles = 100 μ m (C), 20 μ m (D et F), 20 μ m à gauche et 10 μ m à droite (E) (Figure adaptée de Vasile *et al.*, 2017)

Grâce à leur contacts étroits avec les vaisseaux sanguins et les neurones, les astrocytes permettent l'apport de substrats métaboliques aux neurones (glucose, lactate) via des mécanismes bien spécifiques comme la navette du lactate-pyruvate (Wang & Bordey, 2008; Bélanger *et al.*, 2011). De plus, les astrocytes contribuent au fonctionnement synaptique en éliminant les synapses en excès et en libérant des gliotransmetteurs. Parmi ces derniers, il est retrouvé des neurotransmetteurs comme le GABA ou le glutamate, ainsi que la D-sérine, un co-activateur allostérique des NMDAR. D'autres fonctions leurs sont attribuées telles que la recapture de neurotransmetteurs, la production de protéines matricielles et de facteurs trophiques favorisant la maturation synaptique et neuronale comme le NGF (*nerve growth*

factor) et le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), le maintien de la perméabilité et du tonus de la barrière hémato-encéphalique ainsi que l'homéostasie ionique (Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). A ce titre, il a récemment été montré que les astrocytes permettaient la conversion du précurseur du BDNF (pro-BDNF), libéré par les neurones et cellules gliales, en BDNF mature (Vignoli *et al.*, 2016). L'ensemble de ces fonctions confère aux astrocytes un rôle important dans la régulation de la plasticité synaptique (Fellin *et al.*, 2004; Henneberger *et al.*, 2010; Panatier *et al.*, 2006; Sultan *et al.*, 2015). Ces différents mécanismes nécessitent des influx calciques intracellulaires, c'est la signalisation calcique astrocytaire. Cette signalisation peut se propager au réseau astrocytaire, le syncytium astrocytaire, et les activer à leur tour (Khakh & Sofroniew, 2015; Bazargani & Attwell, 2016).

Bien que ce ne soit pas leur fonction à l'état basal, les astrocytes sont capables d'adopter un phénotype inflammatoire dans de nombreuses conditions, lorsque l'intégrité du parenchyme est rompue ou lors de pathologies diverses. Ce phénomène de réactivité astrocytaire est appelé l'astrogliose. Récemment, deux types de réponses astrocytaires identifiées ont été caractérisées ; l'une dans un contexte d'hypoxie où les astrocytes adoptent un profil neuroprotecteur (appelé A2), et l'autre lors d'une stimulation des astrocytes par une protéine membranaire bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS), induisant un profil neurotoxique (appelé A1) (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017).

3.3. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales représentent environ 10% des cellules gliales totales (von Bartheld *et al.*, 2016). Ce sont les cellules immunitaires résidentes du SNC. Elles sont issues de la lignée myéloïde provenant embryologiquement d'une région extra-embryonique : le sac vitellin (Alliot *et al.*, 1999). Morphologiquement, ces cellules sont constituées d'un petit corps cellulaires avec plusieurs prolongements très dynamiques, qui sont sans cesse en état d'élongation et de rétraction, afin d'interagir avec l'environnement (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Ces cellules sont également capables de migrer efficacement, par exemple lors de lésions du parenchyme cérébral. Leurs principales fonctions sont de phagocyter les débris cellulaires et éventuels pathogènes, de produire et libérer des médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, chémokines, monoxyde d'azote (NO) et espèces réactives de l'oxygène (ROS), mais également des facteurs synaptiques comme le BDNF (Parkhurst *et al.*, 2013).

Bien que cette notion soit dépassée, il leur était décrit deux états d'activation en référence à ceux décrits dans les macrophages : un état pro-inflammatoire de type M1 (M1-like) et un état

basal de type M2 (M2-like). La classification astrocytaire A1 et A2 est d'ailleurs inspirée de cette dénomination. Il a par ailleurs été montré que l'expression microgliale de trois facteurs inflammatoires ($Il1\alpha$, $C1qa$ et $Tnf\alpha$) conduit au phénotype astrocytaire neurotoxique A1 (Liddelow *et al.*, 2017). Au cours d'événements pathologiques persistants, les cellules microgliales vont passer par différents phénotypes, aboutissant à une diminution de leurs fonctions trophiques (facteurs neurotrophiques, phagocytose) au profit de la production et de la libération de facteurs inflammatoires.

3.4. Modulation des fonctions gliales par les récepteurs à l'adénosine

L'ensemble des récepteurs adénosinergiques sont exprimés par les cellules gliales (Haskó *et al.*, 2005). Leurs expressions sont souvent faibles au niveau physiologique mais augmentent drastiquement en conditions pathologiques. En ce sens, le système adénosinergique agit comme un système modulateur de l'inflammation.

Concernant les oligodendrocytes, l'adénosine module leurs maturations via les A_1R s et $A_{2A}R$ s. En effet, le A_1R favorise la maturation de oligodendrocytes alors que le $A_{2A}R$ l'inhibe (Figure 17) (Othman *et al.*, 2003; Coppi *et al.*, 2013). L'effet des $A_{2A}R$ s est imputé à l'inhibition des courants potassiques à rectification retardée (I_K) mais pas aux courants potassiques transitoires (I_A). Ces données suggèrent qu'une modification du tonus adénosinergique ou de la balance $A_1R/A_{2A}R$ pourraient être impliquée dans des pathologies démyélinisantes telles la sclérose en plaques, les traumatismes et accidents vasculaires cérébraux (Coppi *et al.*, 2015).

Au niveau astrocytaire, les récepteurs $A_1R/A_{2A}R$ modulent la recapture de neurotransmetteurs. Par exemple, le A_1R inhibe la recapture de GABA alors que le $A_{2A}R$ va augmenter sa recapture, via l'inhibition du A_1R et l'activation de sa voie de signalisation AMPc dépendante (Figure 17) (Cristóvão-Ferreira *et al.*, 2013). De surcroît, le $A_{2A}R$ astrocytaire module la recapture de glutamate par les transporteurs GLT-1 (aussi appelé SLC1A2/EAAT2) et GLAST (aussi appelé SLC1A3/EAAT1) en inhibant la pompe Na^+/K^+ ATPase, essentielle au fonctionnement de ces deux transporteurs (Matos *et al.* 2012; Matos, *et al.* 2012; Matos *et al.* 2013b; Matos *et al.* 2015). Il a également été montré que l'adénosine, via le A_1R astrocytaire, avait un effet immunosupresseur sur l'astrocyte (Liu *et al.*, 2018a), et que le blocage du $A_{2A}R$ prévenait l'astrogliose induite par le FGF (facteur de croissance fibroblastique basique)(Flajolet *et al.*, 2008), sans toutefois que l'activation seule du $A_{2A}R$ n'induisse l'astrogliose (Brambilla *et al.*, 2003). Les A_1R et A_3R astrocytaire ont un rôle anti-inflammatoire (Gessi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018a).

Plusieurs études s'accordent également sur la capacité modulatrice de l'inflammation des A₁R et A_{2A}R microgliaux. Ainsi, il semble que l'activation du A₁R ou le blocage du A_{2A}R réduise drastiquement la réactivité microgliale et leur réponse inflammatoire (Figure 17) (Rebola *et al.*, 2011; Luongo *et al.*, 2014; Madeira *et al.*, 2016, 2018; Huang *et al.*, 2018). Plus particulièrement, l'activation du A₁R microglial permet de limiter la réponse inflammatoire lors de phénomènes hypoxiques, de traumatisme crânien ou de sclérose en plaque (Haselkorn *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2018; Tsutsui *et al.*, 2004). Quant à l'activation du A_{2A}R, celle-ci semble être nécessaire à la formation et à la maintenance de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing*) (Baron *et al.*, 2015; Ouyang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2019). Ce dernier est un complexe multiprotéique composé des protéines NLRP3, PYCARD (*PYD And CARD Domain Containing*, aussi appelé ASC, *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD*) et de la pro-caspase 1. Par l'intermédiaire du clivage de cette dernière en forme active, la caspase 1, celle-ci va cliver la cytokine proinflammatoire pro-IL-1 β en IL-1 β qui sera ensuite libéré par la microglie (Figure 16) (Heneka *et al.*, 2018). Par ailleurs, la caspase 1 peut également induire la pyroptose, une forme de mort cellulaire induite par l'inflammasome.

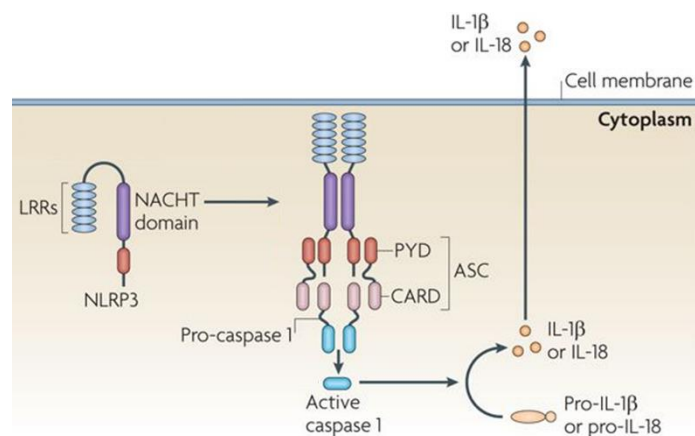


Figure 16 : Structure de l'inflammasome NLRP3 (Tschopp & Schroder, 2010).

Plusieurs travaux viennent tempérer ces observations, montrant que l'activation du A_{2A}R en culture primaire peut être associée à une diminution de l'inflammation médiée par les lipopolysaccharides bactériens (LPS), sans influence du A₁R (Newell *et al.*, 2015). Également, il semble que le rôle pro- ou anti-inflammatoire du A_{2A}R soit médié par les niveaux extracellulaires de glutamate, passant respectivement d'une signalisation dépendante de la protéine kinase A à la protéine kinase C (Dai *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'activation du A₁R et du A_{2A}R régulerait la prolifération microgliale ainsi que la ramification et la dynamique des prolongements microgliaux (Orr *et al.*, 2009; George *et al.*, 2015; Matyash *et al.*, 2017; Gebicke-Haerter *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2013). L'activation du A_{2A}R apparaît essentielle à la libération des facteurs trophiques comme le BDNF par les cellules microgliales (Gomes *et al.*, 2013).

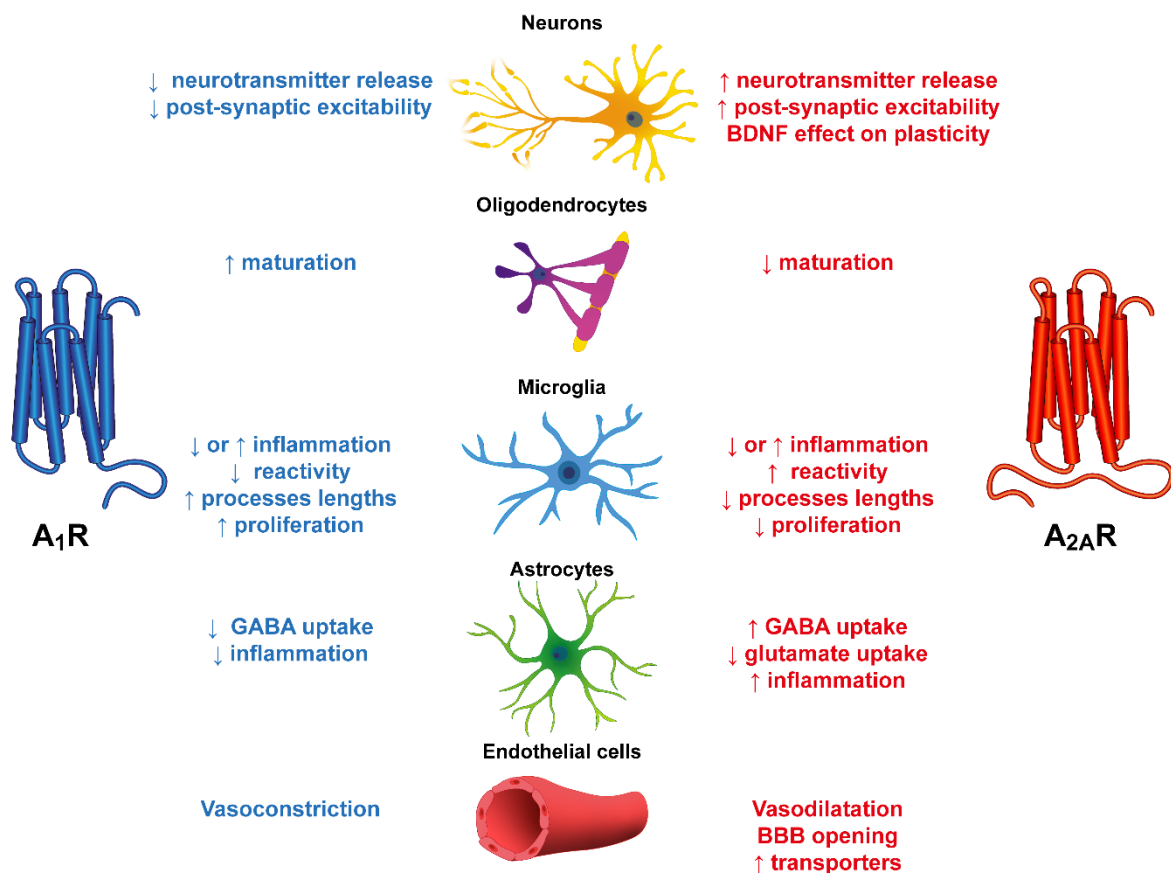


Figure 17 : Fonctions du A₁R et A_{2A}R au niveau cellulaire dans le SNC. Le A₁R va diminuer l'activité synaptique, la réactivité gliale et favoriser la maturation des oligodendrocytes. Le A_{2A}R va lui favoriser l'activation neuronale, augmenter les niveaux extracellulaires de glutamate via les astrocytes, moduler positivement la réactivité gliale et diminuer la maturation des oligodendrocytes. En outre, l'activation du A_{2A}R permet de favoriser l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BBB).

4. Adénosine et synapse tripartite

4.1. En condition basale

Les récepteurs à l'adénosine, en particulier les A₁ et A_{2A}, permettent de réguler finement le fonctionnement des synapses afin d'en améliorer le codage de l'information.

Dans des conditions basales sans stimulation, les taux d'adénosine sont relativement bas. De ce fait, le A₁R, qui est le plus affiné pour l'adénosine, va être majoritairement activé (Figure 18). C'est également le récepteur le plus exprimé dans la majorité des neurones. L'activation du A₁R va diminuer, à la fois, la libération de neurotransmetteur médié par l'influx calcique (Barrie & Nicholls, 1993; Wu & Saggau, 1994; Brambilla *et al.*, 2005) et l'excitabilité post-synaptique via l'internalisation des AMPAR, médiée par la clathrine et induite par une signalisation MAPK (pour *mitogen-activated protein kinases*) (Chen *et al.*, 2014b). De plus, il

a récemment été montré que le A₁R active également les courants potassiques rectifiants entrants activés par les protéines G (aussi appelé GIRK), ce qui a pour conséquence d'hyperpolariser davantage la membrane et de renforcer l'inhibition de la synapse (Chung *et al.*, 2009; James *et al.*, 2018). Ensemble, ces mécanismes permettent de maintenir les synapses à un état de base.

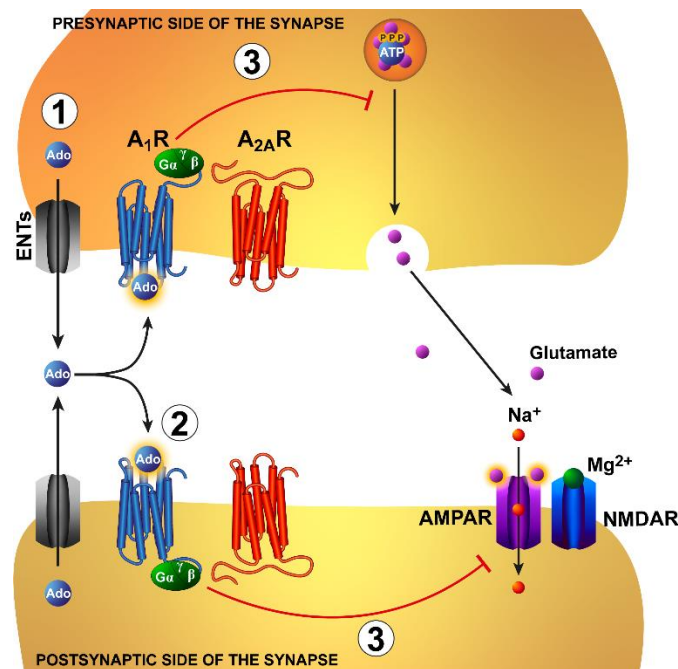


Figure 18 : Rôle des récepteurs A₁ et A_{2A} au niveau synaptique en condition basale. (1) L'adénosine, suite à la dégradation de l'AMP intracellulaire, va être libérée de façon passive dans le milieu extracellulaire. (2) A de faibles niveaux, l'adénosine agit principalement sur les récepteurs A₁. (3) Ces derniers vont moduler négativement la libération de neurotransmetteurs présynaptiques ainsi que l'excitabilité postsynaptique. Inspirée de Cunha, 2016.

4.2. Lors d'une stimulation synaptique

Lors d'un processus cognitif, le neurone présynaptique va libérer des neurotransmetteurs dans la fente synaptique ainsi que de l'ATP. Cet ATP va être clivé par les ectonucléotidases synaptiques et augmenter le tonus de l'adénosine à travers les récepteurs A₁ et A_{2A} (Figure 19). Plusieurs travaux ont montré que le A_{2A}R était physiquement associé aux ectonucléotidases soulevant l'hypothèse que l'adénosine issue du clivage de l'ATP par les ectonucléotidases activerait préférentiellement le A_{2A}R par rapport au A₁R (Cunha *et al.*, 1996a, 1996b; Augusto *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2019a). Dans ces conditions, l'augmentation des niveaux d'adénosine permet de recruter de façon optimale le A_{2A}R, qui va avoir deux effets majeurs.

Le premier effet, contrairement au A₁R, est de favoriser la libération de neurotransmetteurs et d'augmenter l'excitabilité post-synaptique, par association physique du A_{2A}R avec les récepteurs postsynaptiques, ainsi que par la voie de signalisation dépendante de l'AMP cyclique (AMPC) (Figure 19). Le deuxième effet du A_{2A}R est de former des hétérodimères avec les récepteurs responsables de l'inhibition de la synapse, les plus exprimés étant les récepteurs A₁ et cannabinoïdes (CB1R) – tous deux inhibés par le A_{2A}R. Dans ces conditions, la balance d'activation du A₁R/A_{2A}R passe en faveur de l'activation du A_{2A}R qui est excitatrice de la synapse. Ces mécanismes sont essentiels pour favoriser les mécanismes soutenant la cognition comme la LTP. De plus, l'activation du A_{2A}R est essentiel aux effets synaptiques médiés par le BDNF (Jerónimo-Santos *et al.*, 2014; Rebola *et al.*, 2008).

Dans un deuxième temps, les cellules gliales vont également intervenir. En effet, les astrocytes possèdent également des récepteurs à l'ATP et ses dérivés, qui vont détecter l'augmentation locale d'ATP et déclencher des mouvements calciques le long des branchements astrocytaires. Par conséquent, les astrocytes vont libérer de l'ATP dans les synapses voisines qui sera clivée en adénosine, activant préférentiellement les A₁R ce qui va diminuer l'excitabilité des synapses, c'est la dépression hétérosynaptique (Lynch *et al.*, 1977; Manzoni *et al.*, 1994; Pascual, 2005; Chen *et al.*, 2013). La dépression hétérosynaptique liée aux astrocytes mettrait également en jeu les CB1R (Smith *et al.*, 2019). Ainsi, l'action inhibitrice du syntycium astrocytaire permet d'améliorer le ratio signal sur bruit et d'améliorer l'encodage des informations (Cunha, 2016).

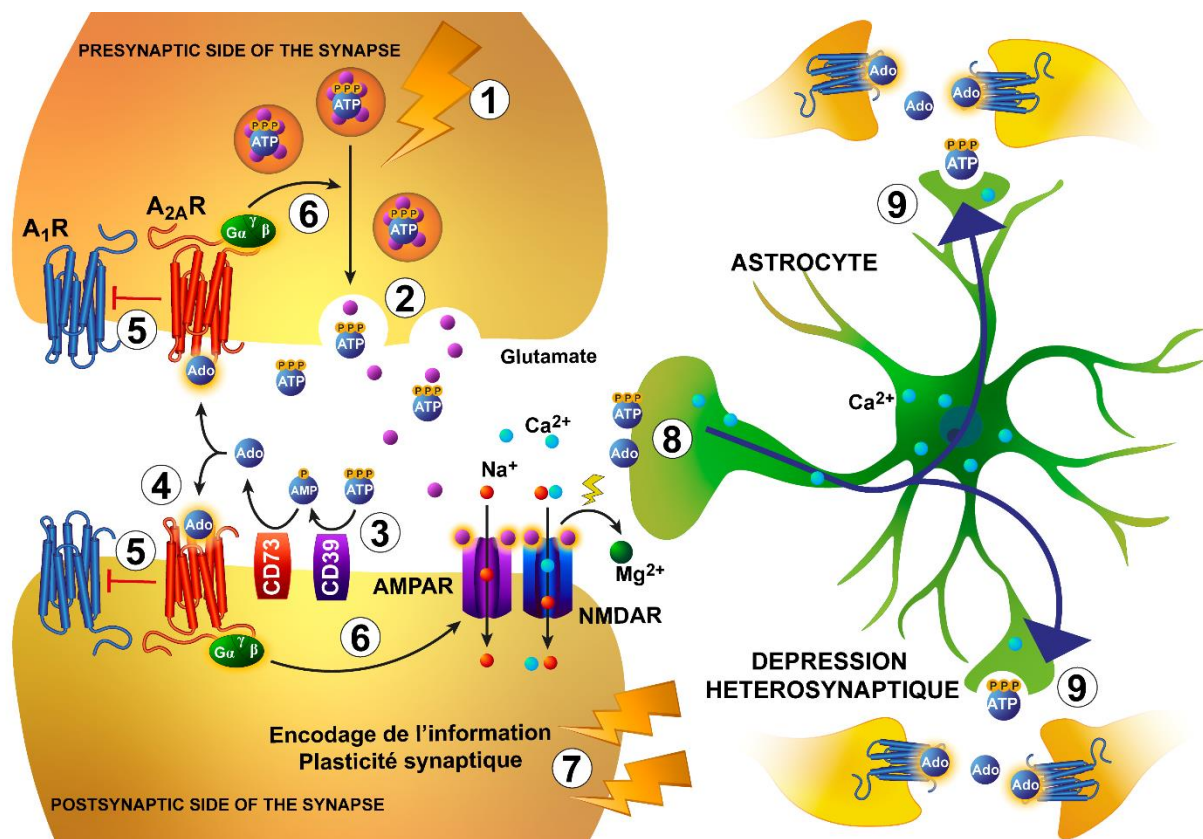


Figure 19 : Rôle des récepteurs A₁ et A_{2A} au niveau synaptique lors d'une stimulation synaptique. (1) La stimulation de l'extrémité présynaptique va induire la libération de vésicules contenant des neurotransmetteurs et de l'ATP (2). (3) Cette ATP va être clivée par les ectonucléotidases CD39 et CD73 en adénosine, permettant l'activation préférentielle des A_{2A}R situés à proximité (4). (5) La signalisation des A_{2A}R va inhiber celles des A₁R (5) et favoriser l'excitabilité de la synapse (6). Ces phénomènes renforcent l'activation de la synapse (7) permettant le bon encodage de l'information et peut mettre en jeu les phénomènes de plasticité synaptique. (8) Les cellules gliales, notamment les astrocytes, vont également être sensibles à cette augmentation d'ATP et ses dérivés. (9) Cela va déclencher des vagues calciques, aboutissant à la libération d'ATP dans les synapses voisines, qui sera dégradé en adénosine et activera préférentiellement les A₁R. C'est la dépression hétérosynaptique. Inspirée de Cunha, 2016.

4.3. Lors d'un excès de stimulation

Les A₁Rs/A_{2A}Rs sont essentiels au bon fonctionnement neuronal cependant ils peuvent être mis à mal et avoir des conséquences néfastes dans plusieurs situations lésionnelles ou pathologiques. Ainsi, lors de stimulation prolongée, comme lors de phénomènes épileptiques ou lors d'une lésion de type ischémie ou traumatique, les cellules en souffrance vont libérer une grande quantité d'ATP dans le milieu extracellulaire et consommer davantage d'ATP (Figure 20). L'augmentation d'adénosine qui en résulte, à la fois au niveau extra- et intracellulaire, va stimuler de façon chronique les récepteurs à l'adénosine. Dans ce contexte,

les $A_{2A}R$ s sont particulièrement activés, ce qui favorise une forte activité synaptique. De plus, les astrocytes libèrent également davantage d'ATP dans un contexte lésionnel, activant à leur tour les synapses voisines. Ensemble, cette activation anarchique va provoquer une toxicité au glutamate, appelé excitotoxicité.

Par ailleurs, les grandes quantités d'ATP, d'adénosine vont par les récepteurs P1 et P2, provoquer la réactivité des astrocytes et cellules microgliales. Cette réponse inflammatoire va être néfaste pour les synapses via la libération de facteurs pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$ et l'IL-1 β (Rivera *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016).

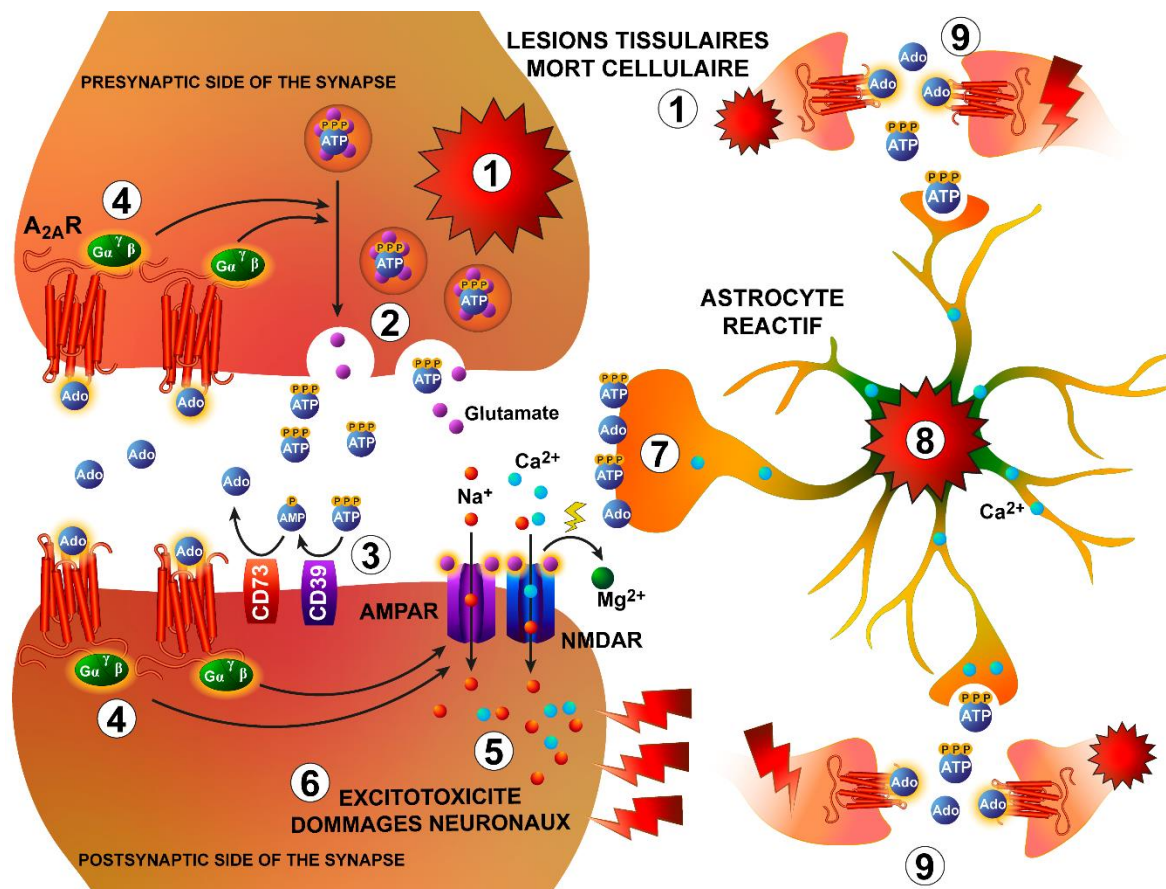


Figure 20 : Rôle des récepteurs A_1 et A_{2A} au niveau synaptique lors d'un stress tissulaire. (1) Lors d'un événement de stress tissulaire tels que l'épilepsie ou une lésion, les cellules en souffrance vont libérer de grandes quantités d'ATP et de glutamate (2). Cette ATP va être clivée par les ectonucléotidases en adénosine (3) et favoriser l'activation préférentielle du $A_{2A}R$, à des niveaux au supraphysiologique (4). Cela va entraîner l'activation des synapses de manière chronique (5), entraînant une excitotoxicité et conduisant à des dommages synaptiques et neuronaux (6). Par ailleurs, l'activation des astrocytes par l'ATP (7), couplés à leur état réactif (8) va accentuer ce phénomène. La libération d'ATP par les astrocytes va renforcer ces mécanismes via l'activation des $A_{2A}R$ (9). Inspirée de Cunha, 2016.

5. Fonctions physiologiques et pathologiques de l'adénosine

En conditions physiologiques, l'adénosine par l'action de ses récepteurs, est impliquée dans de nombreuses fonctions essentielles du cerveau parmi lesquelles se trouve le cycle veille – sommeil, la régulation de la barrière hémato-encéphalique ou encore le contrôle de l'activité motrice. Lors de processus pathologiques, l'augmentation des niveaux d'adénosine va modifier l'action des récepteurs et souvent contribuer de manière néfaste à ces processus, tel que dans l'épilepsie ou dans les maladies neurodégénératives.

5.1. Sommeil et insomnie

L'adénosine joue un rôle crucial dans le sommeil, qui a été pour la première fois mis en évidence en 1954 (Feldberg & Sherwood, 1954). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'activité des cellules consomme de l'ATP et produit de l'adénosine. Ainsi, la quantité d'adénosine augmente graduellement au fil de la journée ainsi que durant une privation de sommeil (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997, 2000). L'activation du récepteur A₁, en particulier dans le cortex et le thalamus, est importante pour l'endormissement et la formation des ondes caractéristiques du sommeil à ondes lentes (Gass *et al.*, 2009; Bjorness *et al.*, 2009). Ce mécanisme implique à la fois le A₁R neuronal mais également l'adénosine kinase et les transporteurs de gliotransmetteurs présents au niveau astrocytaire (Halassa *et al.*, 2009; Bjorness *et al.*, 2016). Parallèlement, l'activation du A_{2A}R dans les neurones dopaminergiques du noyau accumbens et GABAergiques de l'aire pré-optique va inhiber les fonctions d'éveil et ainsi promouvoir le sommeil (Oishi *et al.*, 2017; Lazarus *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Toutefois, lorsque la privation de sommeil persiste au-delà d'une journée, la quantité d'adénosine finit par diminuer également, possiblement liée à diminution de ses précurseurs tels que l'ATP (Clasadonte *et al.*, 2014). L'activation du A_{2A}R dans le noyau accumbens et l'hypothalamus est également intéressante vis-à-vis de l'insomnie, qui est un problème de sommeil concernant 10 à 15% de la population. En effet, une nouvelle molécule a été développée afin d'activer de façon allostérique le A_{2A}R sélectivement au niveau cérébral, afin d'éviter tout effet cardiaque, et de promouvoir l'endormissement des insomniaques (Korkutata *et al.*, 2019).

5.2. Barrière hémato-encéphalique et sclérose en plaques

Une deuxième fonction critique de l'adénosine est le maintien de la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière entoure l'ensemble des vaisseaux et capillaires au sein du

SNC permettant de réguler de façon fine les flux d'ions, de molécules mais également de cellules périphériques (Daneman & Prat, 2015). Elle est composée de trois types cellulaires principaux : les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes. Les cellules endothéliales sont des cellules très fines et liées entre elles par des jonctions serrées, constituant la paroi interne des capillaires sanguins. Ces cellules expriment des transporteurs d'efflux afin de rejeter des molécules lipophiliques vers le sang, et des transporteurs spécifiques de certains nutriments, leur permettant de filtrer les molécules passant du sang vers le cerveau. Autour des vaisseaux sont retrouvés les péricytes, qui vont s'étendre le long des cellules endothéliales, moduler l'angiogénèse, fabriquer la matrice extracellulaire, participer aux phénomènes de réparation et réguler le flux sanguin en réponse à l'activité neuronale (Daneman & Prat, 2015). Enfin, les astrocytes, via leurs extrémités, aussi appelées « pieds astrocytaires » vont recouvrir la quasi-totalité des vaisseaux et permettent l'échange de nutriments via l'aquaporine 4. Les astrocytes permettent de coupler l'activité neuronale aux vaisseaux, régulant ainsi le flux sanguin en libérant la prostaglandine E2 et l'acide époxyéicosatriénoïque afin de dilater les vaisseaux, ou au contraire en libérant l'acide 20-hydroxyéicosatétraénoïque permettant une vasoconstriction (Gordon *et al.*, 2011; MacVicar & Newman, 2015). Ces phénomènes sont, au moins en partie, médiés par l'adénosine (Kim & Bynoe, 2015).

Il est intéressant de constater que le A_{2A}R est particulièrement exprimé au niveau des cellules endothéliales et son activation conduit à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (Yamamoto *et al.*, 2019). Toutefois, dans les maladies auto-immunes démyélinisantes comme la sclérose en plaques ou l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), une augmentation de l'expression du A_{2A}R est observée dans les cellules endothéliales à proximité des zones démyélinisées. L'activation pharmacologique du A_{2A}R prévient la diminution des protéines de jonctions serrées, protégeant ainsi l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Mills *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018b). Enfin, l'activation du A_{2A}R favorise l'expression de transporteurs (P-glycoprotéine et BCRP1) au niveau endothélial, permettant d'améliorer le passage de molécules pharmacologiques à travers la barrière hémato-encéphalique, ouvrant de nouvelles pistes pour traiter les maladies cérébrales (Kim & Bynoe, 2016).

5.3. Tonus adénoenergique et épilepsie

Lors d'un stress cellulaire, une augmentation du tonus adénoenergique apparaît, en lien avec un relargage d'ATP plus important dans le milieu extracellulaire (Brambilla *et al.*,

2005). Ce phénomène est rencontré dans plusieurs contextes pathologiques tels que l'épilepsie (Ilie *et al.*, 2012; Weltha *et al.*, 2018), l'ischémie (Atef *et al.*, 2018; Ganesana & Venton, 2018; Yang *et al.*, 2017) la privation en oxygène-glucose (Melani *et al.*, 1999; zur Nedden *et al.*, 2014), ou encore l'inflammation (Mukandala *et al.*, 2016). L'augmentation d'adénosine à court terme paraît bénéfique, réduisant l'excitabilité des neurones, diminuant la transmission glutamatergique via l'action du récepteur A₁, permettant de lutter contre l'hyperexcitabilité et l'excitotoxicité (Brambilla *et al.*, 2005; Cunha, 2016). L'augmentation du tonus adénoenergique, en bloquant par exemple les transporteurs ENT1, peut être vu comme une piste thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (Lee *et al.*, 2018). Cependant, il y a un inconvénient de taille dans cette stratégie : l'activation chronique du A₁R favorise son internalisation, ce qui induit l'effet inverse, mais va également suractiver les A_{2A}Rs qui sont impliqués dans l'apparition de troubles cognitifs et le développement pathologique comme dans l'épilepsie (Cunha, 2016).

A titre d'exemple, l'épilepsie du lobe temporal est la forme d'épilepsie la plus fréquente et la plus grave (Pitkänen & Lukasiuk, 2011). Elle est caractérisée par une atteinte irréversible de la structure de l'hippocampe et de plusieurs régions du néocortex (Biagini *et al.*, 2013). Comme dans d'autres cas d'épilepsie, il y a une augmentation des niveaux d'ATP et d'adénosine au cours des crises épileptiques soutenues et/ou prolongées (Wall & Dale, 2013; Weltha *et al.*, 2018). Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation d'adénosine induit une diminution de l'activité synaptique via la stimulation des A₁R. Cependant, lorsque ces niveaux d'adénosine augmentent, ils vont activer les A_{2A}R et contrebalancer l'action de l'adénosine d'un mode « inhibiteur » vers un mode « excitateur », ce qui va aggraver l'épilepsie (Barros-Barbosa *et al.*, 2016). Durant cette pathologie, le A_{2A}R est surexprimé dans les astrocytes modifiant leurs capacités de recapture des neurotransmetteurs tel le glutamate et potentiellement impactés la libération de gliotransmetteurs comme le glutamate et l'ATP (Li *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2015; Barros-Barbosa *et al.*, 2016). Il est également retrouvé une augmentation dans les neurones qui renforcerait ces phénomènes excitateurs (Canas *et al.*, 2018). De ce fait, le blocage du A_{2A}R au cours de cette pathologie semble être une approche thérapeutique intéressante (Barros-Barbosa *et al.*, 2016).

5.1. Régulation motrice et maladies neurodégénératives

5.1.1. Les ganglions de la base

Les A_{2A}Rs sont très exprimés dans les ganglions de la base, leur conférant un rôle important dans le contrôle de la motricité (Fredholm *et al.*, 2005a; Rosin *et al.*, 1998).

Anatomiquement, les ganglions de la base, aussi appelés noyaux gris centraux, sont divisés en plusieurs groupes : le noyau caudé, le noyau lenticulaire (lui-même subdivisé en putamen et pallidum), le noyau sous-thalamique et la substance noire, elle-même divisée en *pars compacta* et *pars reticula* (Figure 21). La fonction motrice est contrôlée par deux réseaux distincts : le circuit direct et le circuit indirect (Calabresi *et al.*, 2014; Lanciego *et al.*, 2012).

Le circuit direct concerne le striatum (regroupant le putamen et le noyau caudé), le globus pallidus interne, la substance noire et le thalamus (Figure 21A). L'activation des neurones GABAergiques du striatum, par des afférences corticales glutamatergiques, va induire l'inhibition du globus pallidus interne et de la substance noire *pars reticula*. L'inhibition du thalamus par ces derniers est ainsi levée, permettant au thalamus de stimuler le cortex moteur et d'induire une réponse motrice. De plus, la substance noire *pars compacta* va projeter des efférences dopaminergiques dans le striatum, qui part l'intermédiaire des récepteurs dopaminergiques D₁ (D₁R) vont favoriser l'activation de cette voie (Calabresi *et al.*, 2014; Lanciego *et al.*, 2012). Les récepteurs A₁ sont également exprimés dans ces neurones et vont diminuer l'activité des D₁R (Ferré *et al.*, 1994a; Mango *et al.*, 2014)

Le circuit indirect va concerner le striatum, le globus pallidus externe, le noyau sous-thalamique, la substance noire et le thalamus (Figure 21B). L'activation du striatum par le cortex va inhiber l'activation du globus pallidus externe, lui-même responsable de l'inhibition du noyau sous-thalamique. Ainsi, le noyau sous-thalamique peut stimuler la substance noire *pars reticula* qui, une fois activée, va inhiber le thalamus et donc diminuer la réponse motrice. Dans cette voie, la substance noire *pars compacta* va projeter des neurones dopaminergiques dans les neurones du striatum riches en D₂R et également en récepteurs A_{2A} (Calabresi *et al.*, 2014; Lanciego *et al.*, 2012). La dopamine va inhiber les neurones due à la signalisation inhibitrice du récepteur D₂R, contrairement aux neurones de la voie directe qui possèdent des D₁R excitateurs. Le A_{2A}R lui va à l'instar du A₁R inhiber les D₂R, via des hétérodimères ou des hétérotétramères (Ferré *et al.*, 1994b; Casadó-Anguera *et al.*, 2016; Ferré *et al.*, 2016).

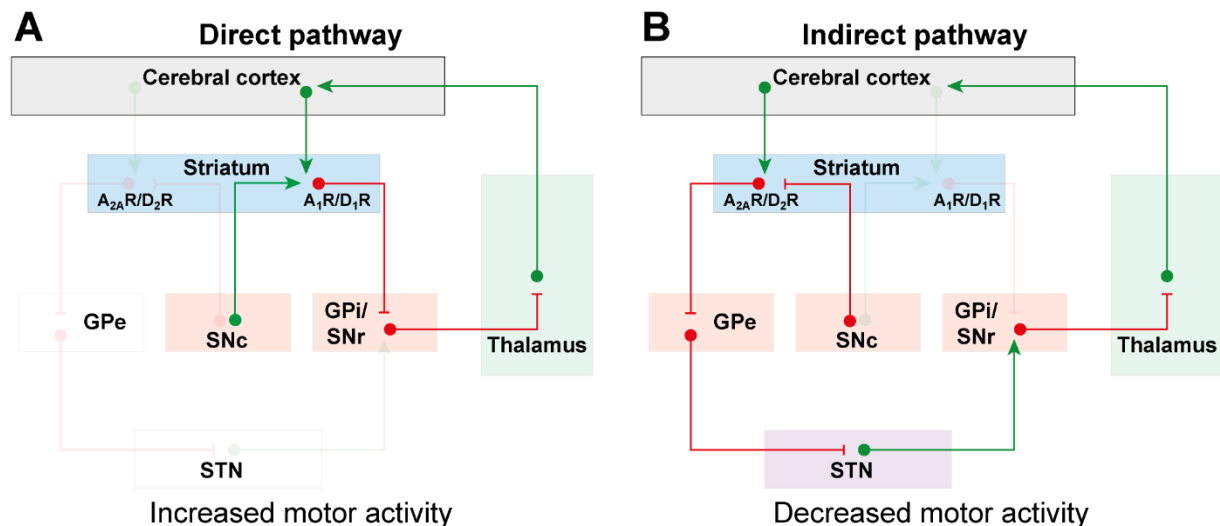


Figure 21 : Les circuits directs et indirects des ganglions de la base. (A) Le circuit direct favorise l'activité motrice tandis que (B) le circuit indirect l'inhibe. Les projections vertes sont excitatrices, les projections rouges sont inhibitrices. GPe : *external globus pallidus*, GPi : *internal globus pallidus*, SNc : *substantia nigra pars compacta*, SNr : *substantia nigra pars reticula*, STN : *subthalamic nucleus*. Adaptée de Lanciego et al., 2012.

Le A_{2A}R est particulièrement enrichi dans les neurones épineux moyens GABAergiques du striatum, au niveau des dendrites et des épines dendritiques (Shindou *et al.*, 2002; Rebola *et al.*, 2005a; Schiffmann *et al.*, 2007), bien qu'ils soient également retrouvés, à de plus faibles niveaux, dans les terminaisons glutamatergiques (Ciruela *et al.*, 2006; Rosin *et al.*, 2003). Ainsi, l'activation pharmacologique du A_{2A}R augmente l'inhibition du thalamus induite par la voie indirecte, ce qui réduit la locomotion (Hauber & Münkler, 1997). Au contraire, le blocage pharmacologique du A_{2A}R a un effet stimulant sur l'activité motrice (Hauber *et al.*, 1998; Popoli *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2008). Par ailleurs, le A_{2A}R est également retrouvé dans les terminaisons glutamatergiques et GABAergiques (Ciruela *et al.*, 2006; Rosin *et al.*, 2003; Shindou *et al.*, 2002).

La balance entre activation et inhibition motrice de ces deux voies est essentielle au maintien du contrôle moteur. Toutefois, cet équilibre est rompu au cours de plusieurs maladies neurodégénératives, comme la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson.

5.1.2. La maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie héréditaire causée par une mutation autosomale dominante du gène de la huntingtine *HTT* (aussi appelé *IT15*). L'huntingtine est une grande protéine de 350 kDa exprimée dans de nombreux types cellulaires dont les neurones et les cellules gliales. La mutation de cette protéine consiste en une répétition de triplets CAG

codant pour une glutamine. L'apparition de la maladie dépend directement du nombre de triplets, ainsi le diagnostic de certitude est établi à partir de 40 triplets, et l'âge d'apparition sera d'autant plus précoce que ce nombre est grand (Blum *et al.*, 2018). A l'heure actuelle, la maladie de Huntington est sans traitement et induit une mort précoce (McColgan & Tabrizi, 2018).

Dans cette maladie, les neurones épineux moyens striato-pallidiaux, riches en D₂R et A_{2A}R, vont progressivement dégénérer, induisant une hypoactivité de la voie indirecte. Ce déséquilibre d'activation entre le circuit direct et le circuit indirect va favoriser des mouvements involontaires anormaux (Figure 22B). Deux types sont décrits dans cette maladie : la chorée qui est une succession de mouvements spontanés excessifs, irréguliers, abrupts et imprévisibles, et d'autres types d'anomalies motrices telles que la dystonie, les troubles de la coordination, l'akinésie, les troubles oculomoteurs, etc.

Le ciblage pharmacologique du A_{2A}R a été rapidement envisagé du à leur abondance relative dans les régions touchées (Cha *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2000). Le modèle murin de la maladie de Huntington le plus étudié est la souris R6/2 qui développe des agrégats de huntingtine au niveau neuronal, associé à des altérations motrices, une perte de poids et une mort précoce (Mangiarini *et al.*, 1996). Dans ce modèle, le blocage pharmacologique du A_{2A}R permet de réduire les déficits de mémoire spatiale et de réduire l'excitotoxicité lié au récepteur NMDA (Domenici *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015b). L'activation du A_{2A}R dans ce même modèle réduit la formation d'agrégats d'huntingtine et les troubles moteurs (Chou *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2011). A l'inverse, le blocage du A_{2A}R dans un autre modèle de la maladie, la souris N171-82Q, réduit l'espérance de vie et accentue les troubles moteurs (Mievis *et al.*, 2011). Ces résultats mitigés peuvent s'expliquer par le fait que le A_{2A}R est exprimé dans de nombreux types cellulaires impliqués dans cette maladie. Leur expression évoluant indépendamment au cours de la maladie, cela peut expliquer que le A_{2A}R soit bénéfique précocement et délétère plus tard au cours de la maladie (Domenici *et al.*, 2019). L'activation du A₁R paraît être bénéfique (Blum *et al.*, 2002; Zuchora *et al.*, 2001), ce récepteur diminuant à la fois au niveau cortical et striatal dans le modèle R6/2 et chez les patients symptomatiques (Matusch *et al.*, 2014). Ainsi, bien que le système adénosinergique soit impliqué dans l'évolution de cette maladie, son ciblage paraît être une solution thérapeutique peu envisageable à l'heure actuelle.

5.1.3. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson, est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. Elle est caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* de la substance noire associée à l'agrégation d'une protéine, l' α -synucléine, sous forme de corps de Léwy (Jakowec & Petzinger, 2004; Campos-Romo *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2018). Cette mort neuronale résulte en une hypoactivité du circuit direct et une hyperactivité du circuit indirect, ce qui va diminuer les capacités motrices des patients (Figure 22A).

Le traitement actuel de cette maladie est l'administration de L-DOPA, un précurseur de la dopamine, permettant de compenser la perte des neurones dopaminergiques (Kim *et al.*, 2017; Obeso *et al.*, 2000). Toutefois, ce traitement présente l'inconvénient, après plusieurs années, d'augmenter les dyskinésies, qui sont des mouvements anormaux involontaires, impactant sévèrement la qualité de vie des patients. Plusieurs pistes ont été envisagées pour réduire ces effets secondaires dont le blocage des $A_{2A}R$ s (Beggiato *et al.*, 2016; Morin *et al.*, 2016; Rascol *et al.*, 2015). En effet, le blocage du $A_{2A}R$ semble particulièrement intéressant car il permet, en plus de réduire les symptômes moteurs, de ralentir le déclin cognitif et la dépression liée à la maladie, ainsi que d'en limiter l' α -synucléinopathie (Kachroo & Schwarzschild, 2012; Ferreira *et al.*, 2016, 2018; Pinna *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Malgré son manque d'effet bénéfique du blocage du $A_{2A}R$ en tant que monothérapie de la maladie de Parkinson (Hauser *et al.*, 2014), l'antagoniste du $A_{2A}R$ istradefylline (aussi appelé KW-6002) est en cours de phase III et est déjà autorisé comme option thérapeutique de la maladie de Parkinson au Japon où il est administré précocément en association avec le L-DOPA pour réduire les symptômes moteurs et la dyskinésie (Bara-Jimenez *et al.*, 2003; Borea *et al.*, 2016; Oertel & Schulz, 2016).

Compte-tenu de la tolérance et de l'absence d'effet secondaire majeur des antagonistes du $A_{2A}R$, il serait intéressant de considérer d'utiliser ces molécules dans le cadre d'autres maladies neurodégénératives. En effet, le système adénoenergique est également mis à défaut dans d'autres maladies neurodégénératives, et notamment la plus répandue : la maladie d'Alzheimer (Alonso-Andrés *et al.*, 2018).

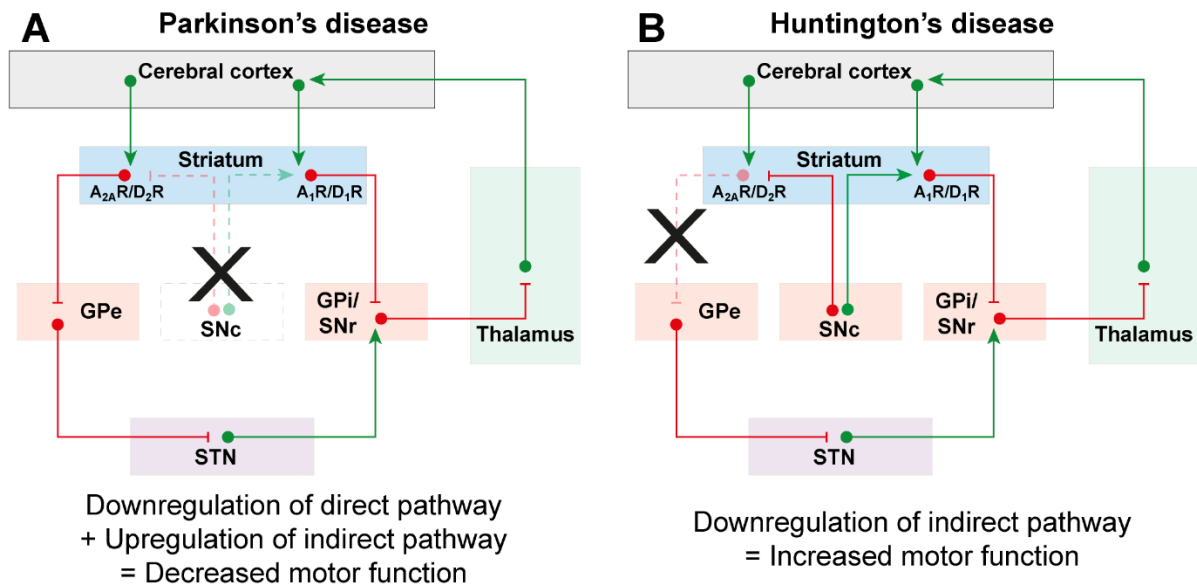


Figure 22 : Atteinte des circuits des ganglions de la base dans la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson. (A) La perte des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta durant la maladie de Parkinson favorise la diminution de la motricité. **(B)** A l'inverse, la dégénération des neurones striato-pallidaux de la voie indirecte dans la maladie de Huntington favorise une augmentation de la fonction motrice. Les projections **vertes** sont excitatrices, les projections **rouges** sont inhibitrices. GPe : *external globus pallidus*, GPi : *internal globus pallidus*, SNc : *substantia nigra pars compacta*, SNr : *substantia nigra pars reticulata*, STN : *subthalamic nucleus*. Adaptée de Lanciego *et al.*, 2012.

Chapitre III : Maladie d'Alzheimer & tauopathies

1. La maladie d'Alzheimer

1.1. Épidémiologie

Suivant l'augmentation de la durée de vie de l'Homme, des maladies liées à l'âge et au vieillissement sont apparues et pèsent de plus en plus lourd sur la société. Ainsi, les démences sont définies par l'Organisation mondiale de la Santé comme « un syndrome d'évolution chronique dans lequel apparaît une altération de la fonction cognitive plus importante que celle attribuée au vieillissement normal, affectant de nombreuses fonctions cognitives parmi lesquels la mémoire, le raisonnement, les capacités d'apprentissage, le langage sans toutefois toucher la conscience » (OMS, 2019). On compterait actuellement 50 millions de cas de démence de par le monde, avec plus de 10 millions de nouveaux cas par an. Prêt de 70% des cas sont attribués à la maladie d'Alzheimer, ce qui en fait la forme de démence la plus répandue à travers le monde (Scheltens *et al.*, 2016). Cette maladie est également impliquée dans la moitié des décès survenant après 85 ans (Vinters, 2015; Graham *et al.*, 2017). Il est estimé par l'Alzheimer's Disease International que les cas de démences vont augmenter à 80 millions en 2030 et 150 millions à l'horizon 2050 (World Alzheimer Report 2018), ce qui en fera un des plus gros enjeux de santé publique avec un coût économique conséquent pour la société. En 2018, le coût mondial lié aux démences était estimé à 1 000 milliards de dollars, et celui-ci est estimé à 2 000 milliards d'ici 2030 (World Alzheimer Report 2018).

1.2. Les lésions caractéristiques

Le diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer repose sur l'identification *post mortem* de deux lésions caractéristiques au sein du cerveau : d'une part, des dépôts extracellulaires formés d'une accumulation de peptides amyloïdes β (A β) (de 37 à 43 acides aminés, dérivant du clivage successif de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)) et d'autre part, de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), caractérisée par l'accumulation intraneuronale de protéines tau hyper- et anormalement phosphorylées (De Strooper, 2010; Wang & Mandelkow, 2016).

2. Le peptide amyloïde A β et la pathologie amyloïde

2.1. Gène et structure du précurseur du peptide amyloïde (APP)

Le peptide amyloïde A β est issu du clivage séquentiel de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). Le gène *APP* est localisé sur le chromosome humain 21q21.3 (Kang *et al.*, 1987) et est constitué de 19 exons soumis à un épissage alternatif des exons 7, 8 et 15, donnant lieu à des dizaines d'isoformes allant de 365 à 770 acides aminés, avec trois principales isoformes : APP695, APP751 et APP770 (Figure 23). Il est à noter que ces trois isoformes peuvent conduire à la production de peptides A β (Yoshikai *et al.*, 1990; Zheng & Koo, 2006). L'APP est une protéine ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus, mais des différences d'expression ont été rapportées, notamment l'APP695, qui est particulièrement exprimée dans les neurones contrairement aux APP751 et 770 qui sont retrouvés dans les autres types cellulaires (Golde *et al.*, 1990; Neve *et al.*, 1986).

Structurellement, l'APP est composé de trois parties communes à toutes les isoformes : un domaine transmembranaire, un segment N-ter et un segment C-ter. La partie extracellulaire est très longue, avec notamment un peptide signal, un domaine riche en cystéine E1, un domaine KPI (*kunitz protease inhibitor*), un domaine antigène Ox-2, un domaine E2 et une partie du peptide A β (Figure 23). L'autre partie du peptide A β est intégralement située dans le domaine transmembranaire. L'épissage des exons 7 et 8 conditionne respectivement l'inclusion des domaines KPI et Ox-2. Le court domaine intracellulaire contient un motif d'internalisation et de nombreux sites de phosphorylation (Chen *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2017).

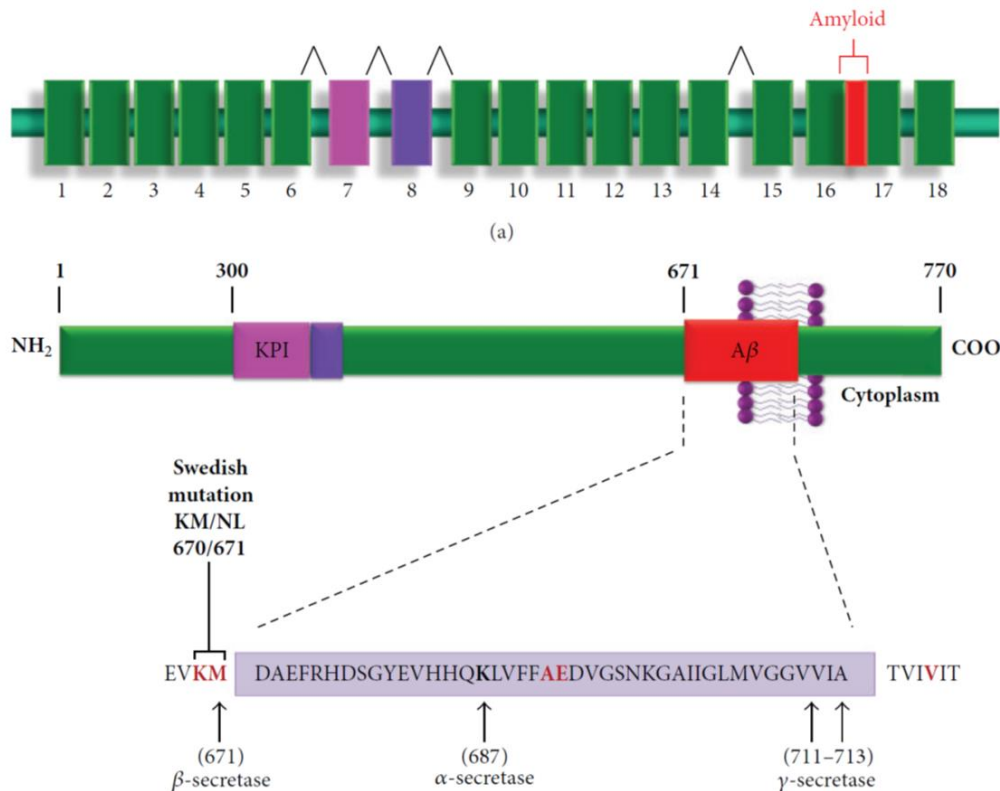


Figure 23 Structure de l'APP humain. L'APP humain est constitué de 18 exons dont trois sont soumis à épissage alternatif (7, 8 et 15). Les trois sites de clivage des α -, β - et γ -sécrétases se trouvent dans la région du peptide A β (Meraz-Ríos *et al.*, 2014).

2.2. Fonctions physiologiques du précurseur du peptide amyloïde (APP)

L'APP est une protéine à courte demi-vie dont les fonctions sont encore mal comprises. L'APP est capable de s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec des membres de la même famille via son domaine KPI (Deyts *et al.*, 2016). L'APP interagit via ses domaines extracellulaires E1 et E2 avec les protéoglycanes de l'héparan sulfate, jouant un rôle dans l'adhésion des cellules (Kibbey *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 2017). Il aurait également des fonctions trophiques envers les neurones, favorisant leur survie et leur croissance neuritique (Penke *et al.*, 2017). L'enrichissement relatif de l'APP au niveau post-synaptique suggère un rôle important dans la synaptogénèse et la maintenance des synapses (Löffler & Huber, 1992; Shigematsu *et al.*, 1992). Cela a été confirmé en montrant que la perte d'expression de l'APP réduit l'activité synaptique et que la surexpression augmente la densité en épines dendritiques (Hérard *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010). Ces mécanismes font une fois de plus intervenir les mécanismes d'adhésion cellulaire (Dawkins *et al.*, 2014). De plus, quelques études ont montré une influence de l'APP sur l'expression de plusieurs sous unités des récepteurs glutamatergiques AMPAR et NMDAR (Cousins *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010), ce qui

supporte l'effet de l'APP sur la LTP (Mileusnic *et al.*, 2000; Puzzo *et al.*, 2017; Seabrook *et al.*, 1999).

Seul 10% de l'APP se localise à la membrane cellulaire, avec un *turn over* important de 30 à 90 minutes (LeBlanc *et al.*, 1996; Herreman *et al.*, 2003; Thinakaran & Koo, 2008; Choy *et al.*, 2012). L'APP est ainsi rapidement dégradé ou clivé par une famille d'enzymes : les sécrétases.

2.3. Clivage du précurseur du peptide amyloïde (APP)

L'APP est la cible de nombreuses sécrétases (Haass *et al.*, 2012), libérant ainsi différents fragments aux fonctions diverses et parfois opposées. Il est classiquement décrit deux voies principales : la voie amyloïdogénique démarrée par la β -sécrétase et la voie non amyloïdogénique démarrée par l' α -sécrétase, aboutissant respectivement à la production d'A β ou non. Les produits de clivages résultant de l'action de l' α - ou β -sécrétase sont ensuite clivés via l'action d'un complexe protéique à activité γ -sécrétase (Figure 24). Les activités α -sécrétases sont portées par les enzymes de la famille « *désintégrine A et métalloprotéase* » (ADAM). ADAM10 apparaît être l'enzyme responsable du clivage non amyloïdogénique constitutif (Kuhn *et al.*, 2010). Des mutations dans le gène ADAM10 ont notamment été décrit comme facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (Karch & Goate, 2015). L'activité β -sécrétase est liée à l'enzyme de clivage de l'APP sur le site β (BACE1). Les mutations de l'APP favorisant le clivage par la β -sécrétase sont également associées à l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Dai *et al.*, 2018; Karch & Goate, 2015). Enfin, l'activité γ -sécrétase est liée à un complexe protéique de haut poids moléculaire nécessitant au minimum 4 protéines pour être fonctionnelle : la préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2), la nicastrine (NCT), l'antérieur pharynx defective (Aph-1 ou Aph-2) et la préséniline enhancer (Pen-2) (Annaert & De Strooper, 2010). La PS1 et PS2 sont des aspartyl-protéases et portent le site d'action catalytique. Ce complexe se construit progressivement le long du réseau réticulum endoplasmique – Golgi et mature dans le réseau trans-golgien avant d'arriver à la surface cellulaire (Kim *et al.*, 2007; Osenkowski *et al.*, 2009). Les mutations de PS1 et PS2 sont, au même titre que les mutations APP, les principaux facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer (Karch & Goate, 2015), composant les formes familiales, qui représentent moins de 1% des cas (Reitz & Mayeux, 2014).

La voie non amyloïdogénique est la principale voie de clivage de l'APP, résultant pour près de 90% de sa protéolyse (Figure 24) (Penke *et al.*, 2017). Elle implique le clivage de l'APP par l' α -sécrétase au niveau des résidus Lys612/Leu613 de l'APP695 (correspondant

aux Lys16/Leu17 du peptide A β), ce qui *de facto* neutralise la production de ce peptide (Anderson *et al.*, 1991; Esch *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1991). Ce clivage réalisé à la surface de la cellule libère le fragment soluble de l'APP (sAPP α) au niveau extracellulaire et un fragment C-ter (α -CTF aussi appelé C83). Ce court fragment α -CTF est davantage clivé par l'activité γ -sécrétase pour libérer un fragment P3 dans le milieu extracellulaire et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) à l'intérieur de la cellule (Haass *et al.*, 1993).

La voie amyloïdogénique concerne 10% du clivage de l'APP en condition physiologique (Figure 24) (Penke *et al.*, 2017). La production du peptide A β résulte du clivage séquentiel de l'APP par l'activité β - puis γ -sécrétase, qui se fait le long de la voie de l'endocytose. Le clivage β -sécrétase se fait au niveau des résidus Met596 et Asp597 de l'APP695, précédant le 1^{er} résidu du peptide A β . Ce clivage β -sécrétase résulte en la production d'un fragment soluble de l'APP (sAPP β) dans la lumière de l'endosome et d'un fragment C-terminal (β -CTF ou C99) transmembranaire. L'activité γ -sécrétase clive ensuite le β -CTF en deux fragments : le peptide A β 1-X (X variant de 34 à 50 acides aminés) qui sera sécrété dans le milieu extracellulaire, et l'AICD libéré dans le cytoplasme (van der Kant & Goldstein, 2015).

Il est également intéressant de mentionner que de récents travaux ont mis en évidence le rôle d'autres protéines (δ -sécrétase, la η -sécrétase et la méprine b) dans le métabolisme de l'APP (Andrew *et al.*, 2016).

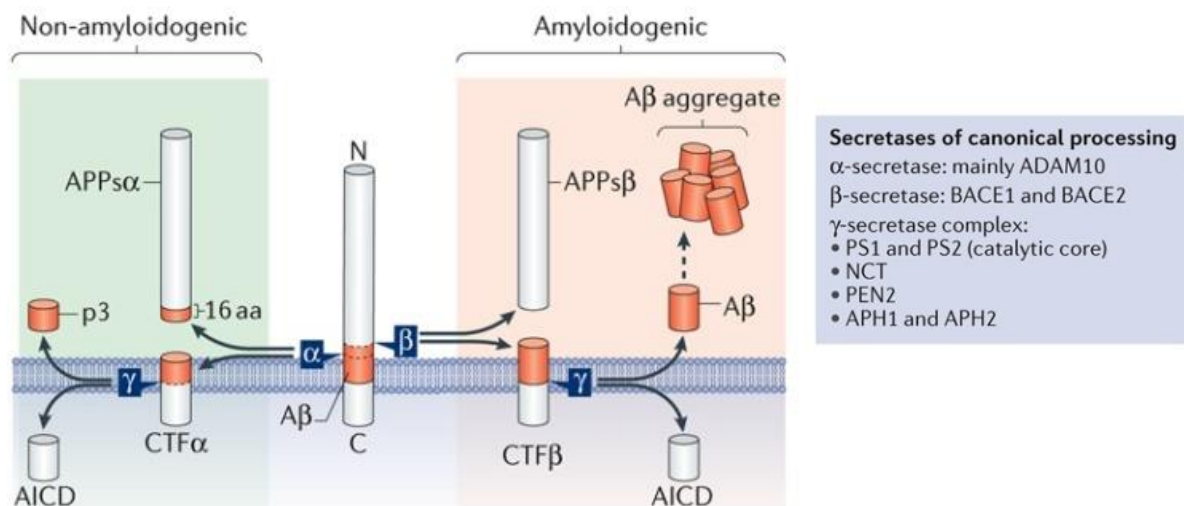


Figure 24 Les principales voies de clivage de l'APP. Le clivage de l'APP par l' α - puis γ -sécrétase permet d'orienter vers la voie non amyloïdogénique. A l'inverse, le clivage par la β - puis γ -sécrétase favorise la production de peptide amyloïde. (Müller *et al.*, 2017).

2.4. Rôle pathologique du peptide A β

L'accumulation de peptides A β et leur agrégation sous forme de dépôts amyloïdes et plaques séniles forment des lésions histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Cette accumulation semble être liée à production accrue d'espèces pro-agrégantes, ainsi qu'à un défaut de leur clairance (Baranello *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2017). Dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer la forme A β_{1-40} est la plus abondante. Cependant, A β_{1-42} est la forme majoritairement présente dans les agrégats, grâce à sa capacité accrue à former des oligomères (Figure 25) (Jarrett *et al.*, 1993a, 1993b; El-Agnaf *et al.*, 2000). Les oligomères d'A β se regroupent sous formes de fibrilles qui vont s'agréger en dépôts (Benseny-Cases *et al.*, 2007). Au sein des agrégats, les peptides A β sont insensibles aux phénomènes de dégradation ou de clivage protéolytique.

Les oligomères d'A β apparaissent plus toxiques que les plaques elles-mêmes (Walsh & Selkoe, 2004; Reiss *et al.*, 2018), même si les dépôts amyloïdes sont associés à des neurites dystrophiques et à une réactivité micro- et astrogliale locale. L'origine de l'agrégation des peptides A β demeure mal comprise. Certains auteurs suggèrent qu'elle est liée à des modifications post traductionnelles (Kumar *et al.*, 2011; Schlenzig *et al.*, 2009; Thal *et al.*, 2015) et que l'agrégation est initiée au sein des neurones plutôt que dans l'espace extracellulaire (Friedrich *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2017).

Les dépôts amyloïdes sont également présents chez les patients non déments (Mackenzie, 1994) et leur seule présence ne suffit pas à prédire la survenue de la maladie d'Alzheimer (Dubois *et al.*, 2018). Le développement de ces lésions dans le cerveau au cours de cette maladie suit une progression spatio-temporelle stéréotypée, qui a été caractérisée par les stades de Thal (Thal *et al.*, 2000). Cette progression démarre dans le néocortex avant d'atteindre les régions allocorticales, puis les noyaux diencephaliques, le striatum et les noyaux cholinergiques, et enfin le tronc cérébral, pour finalement s'étendre à l'ensemble du cerveau (Thal *et al.*, 2002). En plus de l'évolution spatiale, des changements au niveau de la composition des dépôts amyloïdes suivent les stades de Thals, avec une augmentation des formes A β solubles et une diminution des formes A β insolubles (Thal *et al.*, 2015). L'initiation de la pathologie amyloïde reste incertaine dans les formes sporadiques contrairement aux formes familiales (Musiek & Holtzman, 2015).

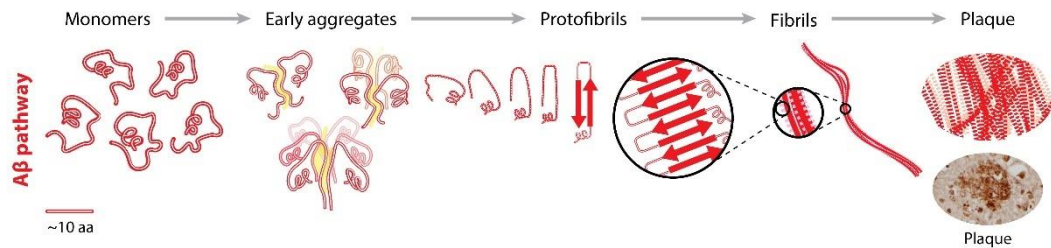


Figure 25 Processus d'agrégation du peptide Aβ. Les monomères d'Aβ vont former des oligomères, puis ces derniers vont se rassembler en protofibrilles puis fibrilles, qui sont localisées dans les dépôts amyloïdes (Graham *et al.*, 2017).

3. La protéine tau et la pathologie tau

3.1. Gène et structure de tau

La protéine tau est exprimée préférentiellement au sein des neurones dans le SNC. Son gène *MAPT* (pour *microtubule associated protein tau*) est localisé sur le chromosome humain 17q21 et est constitué de 16 exons soumis à un épissage alternatif, donnant naissance à 6 isoformes de tau (Sergeant *et al.*, 2008; Wang & Mandelkow, 2016). Les exons soumis à épissage alternatifs sont les exons 2, 3 et 10. L'inclusion ou non de l'exon 10, codant pour le deuxième domaine de liaison aux microtubules, donne respectivement la tau 3R (pour trois domaines de liaisons aux microtubules) et 4R (pour quatre domaines). La protéine tau humaine varie ainsi en taille, allant de 352 à 441 acides aminés (Figure 26A). L'expression des différents isoformes est régulée au cours du développement avec l'expression foetale d'une forme unique : Tau 0N3R. Dans le cerveau adulte, la proportion de tau 3R et 4R est équilibré à 1:1 (Goedert *et al.*, 1989).

Structurellement, tau est divisée en deux grandes parties : d'une part, une région acide comprenant l'extrémité N-ter et le domaine de projection permettant l'interaction avec d'autres éléments du cytosquelette, les mitochondries, la membrane plasmique et des partenaires protéiques ; et d'autre part, une région basique composée d'un domaine riche en prolines, d'un domaine de liaison aux microtubules, constitué de trois à quatre domaines répétés (3R ou 4R), et de l'extrémité C-ter (Sergeant *et al.*, 2008; Wang & Mandelkow, 2016).

3.2. Modifications post traductionnelles de tau

Depuis que tau a été découverte hyperphosphorylée au sein des DNFs (Brion *et al.*, 1985a; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986), beaucoup de travaux ont été réalisés afin d'étudier ses modifications post-traductionnelles de tau. Ainsi, tau est une protéine sujette à de nombreuses

modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation (la plus étudiée) mais également l'acétylation (Cohen *et al.*, 2011), la nitration (Horiguchi *et al.*, 2003), la glycation (Ledesma *et al.*, 1995), l'O-glycosylation (Arnold *et al.*, 1996), l'ubiquitination (Cripps *et al.*, 2006), la SUMOylation (Dorval & Fraser, 2006), la liaison par transglutaminase, l'isomérisation (Miyasaka *et al.*, 2005), ou encore le clivage protéolytique (Gamblin *et al.*, 2003).

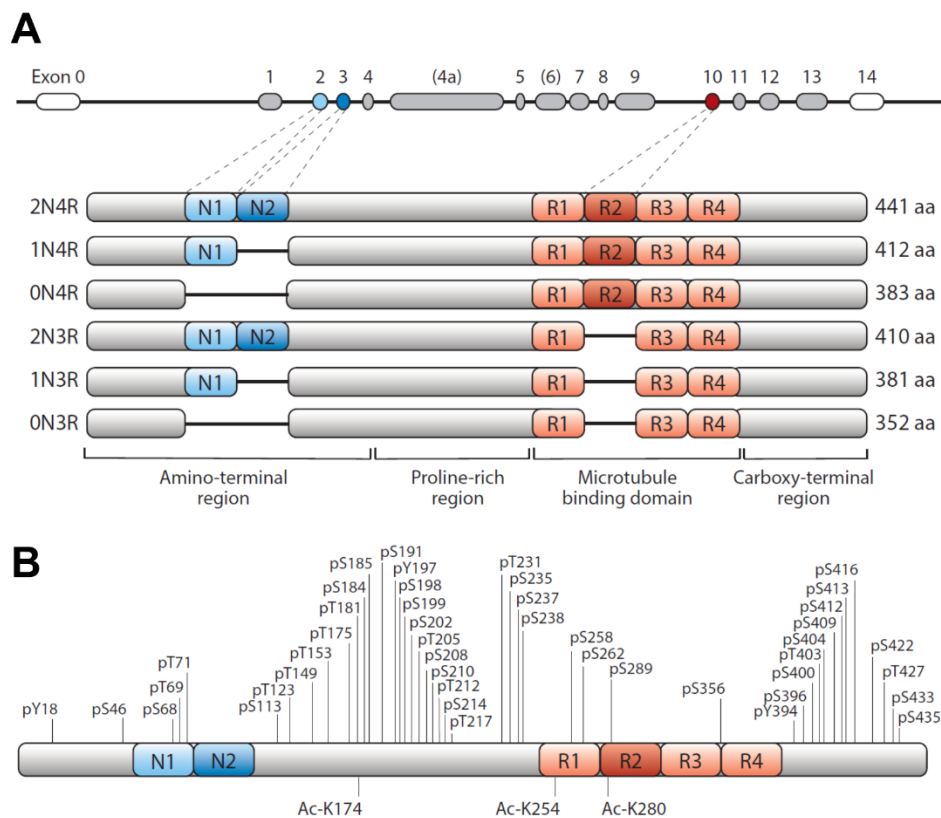


Figure 26 Gène, structure et sites de phosphorylation de la protéine tau. (A) L'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 permet de donner naissance à 6 isoformes de tau. (B) Principaux sites de phosphorylation de la protéine. (Götz *et al.*, 2019)

La protéine tau possède plus de 85 sites potentiels de phosphorylation (Sergeant *et al.*, 2008), sous le contrôle de nombreuses kinases et phosphatases. Chez les patients, la phosphorylation de tau augmente d'un facteur 2 ou 3 par rapport à un cerveau sain (6-8 mol P/mole de tau vs 2-3 mol P/mole de tau respectivement) (Köpke *et al.*, 1993). Actuellement, 63 sites de phosphorylation de tau ont été décrits comme phosphorylés dans les souris, modèles ou non de la maladie d'Alzheimer (Morris *et al.*, 2015), et 42 au sein des DNFs chez l'Homme (40 Ser/Thr et 2 Tyr) (Figure 26B) (Hasegawa *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995; Hanger *et al.*, 1998). Cette phosphorylation se fait essentiellement sur des motifs Serine ou Thréonine suivis d'un résidu Proline, qui sont la cible de nombreuses

protéines kinases dirigées par des prolines (PDK, de l'anglais *proline directed kinase*). On retrouve dans cette classe PDK la principale kinase de Tau, la GSK3 β , mais également la cyclin-dependent like kinase-5 (cdk5) et la dual specificity tyrosin phosphorylation regulate kinase 1A (DYRK1A) (Arioka *et al.*, 1993; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995; Woods *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008). D'autres kinases phosphorylent également tau, dont la calcium/calmoduline-activated proteine kinase II (CaMKII), la microtubule affinity regulated kinase 110 (MARK p110), la protéine kinase A (PKA) et la caséine kinase 1 (CK1) (Baudier & Cole, 1988; Drewes *et al.*, 1997; Ledesma *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1996, 1997; Sironi *et al.*, 1998). La principale phosphatase de tau est la PP2A, responsable de 70% de l'activité phosphatase dans le cerveau (Bennechib *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005).

3.3. Processus d'agrégation de tau

Comme mentionné précédemment, les filaments appariés en hélice (PHF, de l'anglais *paired helical filaments*) observés dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont constitués de protéines tau (Figure 27) (Brion *et al.*, 1985b; Delacourte & Defossez, 1986) dans un état anormalement phosphorylé (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). De récents travaux ont montré la structure de tau au cœur des filaments par microscopie cryo-électron (cryo-EM) dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Pick et l'encéphalopathie traumatique chronique, révélant des structures distinctes, suggérant que les mécanismes conduisant à l'agrégation de tau dans ces trois maladies sont potentiellement différents (Fitzpatrick *et al.*, 2017; Falcon *et al.*, 2018, 2019). Tau est intrinséquement une protéine désordonnée, sans structure tertiaire (Jeganathan *et al.*, 2008), même si plusieurs éléments de structures secondaires transitoires et stabilisés par des phosphorylations particulières, dans la région Ser202/Thr205 et Thr231 ont été décrits (Gandhi *et al.*, 2015; Mukrasch *et al.*, 2009; Schwalbe *et al.*, 2015; Sibille *et al.*, 2012). Une implication de la phosphorylation dans le processus d'agrégation de tau est encore discutée dans la communauté scientifique, avec seulement quelques études établissant un lien direct entre ces deux événements (Alonso *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Despres *et al.*, 2017)

La quantité de dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau corrèle avec l'évolution des troubles cognitifs contrairement aux dépôts amyloïdes (Alafuzoff *et al.*, 1987; Arriagada *et al.*, 1992; Braak & Braak, 1991; Brier *et al.*, 2016; Grober *et al.*, 1999; Maass *et al.*, 2017; Pontecorvo *et al.*, 2019; Schwarz *et al.*, 2016).

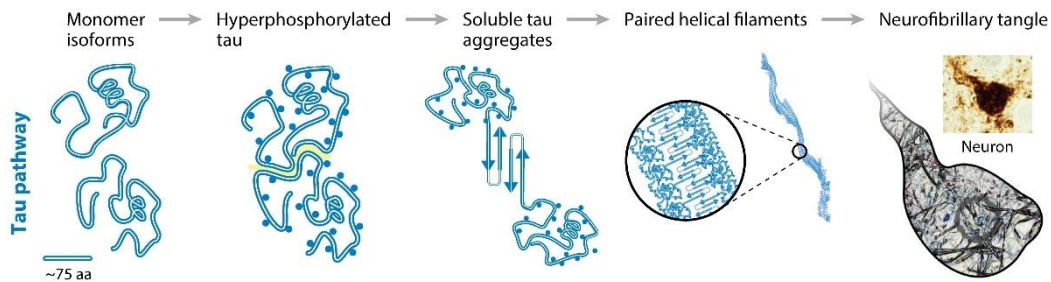


Figure 27 : Processus d'agrégation de tau. La protéine tau sous formes monomériques va pouvoir adopter une conformation particulière via l'accumulation de modifications post-traductionnelles. Cette forme conformationnelle va former des oligomères pour ensuite s'assembler sous formes de PHS, qui compose la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) au sein des neurones (Graham *et al.*, 2017).

3.4. Fonctions physiologiques de tau

La protéine tau est pléiotropique (Figure 28). Elle fut à l'origine décrite comme un facteur permettant l'assemblage des microtubules, d'où son acronyme (*Tubulin associated unit*) (Weingarten *et al.*, 1975; Witman *et al.*, 1976). L'affinité de tau pour les microtubules est modulée par son nombre de domaines de liaison aux microtubules (*microtubule binding domain*, R1 à R4). En effet, les formes 4R ont plus d'affinité pour les microtubules que les formes 3R (Gustke *et al.*, 1994; Goode *et al.*, 1997; Panda *et al.*, 2003). Cette interaction semble impliquer des liaisons ioniques car les domaines de liaisons aux microtubules sont chargés positivement et les microtubules le sont négativement (Jho *et al.*, 2010; Kadavath *et al.*, 2015). Il a également été révélé, par cryo EM, que des tandems de domaines de liaisons aux microtubules pouvaient interagir avec les dimères de tubulines α - β , stabilisant ainsi le profilaments (Kellogg *et al.*, 2018). La région N-ter de tau régule, quant à elle, l'espace entre les microtubules (Frappier *et al.*, 1994). Enfin, tau régule également les moteurs moléculaires comme la kynésine et la dynéine, qui permettent le transport de protéines le long de l'axone, comme des facteurs neurotrophiques et des protéines malconformées (Chevalier-Larsen & Holzbaaur, 2006; Dixit *et al.*, 2008). La protéine tau régule également le trafic des mitochondries le long de l'axone (Mandelkow *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2004).

Sur le plan métabolique, il a récemment été montré au laboratoire que tau était nécessaire au bon fonctionnement de la voie de signalisation de l'insuline (Marciniak *et al.*, 2017). Ainsi la délétion de tau conduit à une perte de l'effet anorexigénique de l'insuline dans l'hypothalamus, alors que la surexpression de tau améliore la réponse du cerveau à l'insuline (Leboucher *et al.*, 2019). Cet effet bénéfique de tau serait dû à son interaction avec la protéine PTEN (*phosphatase and tensin homologue on chromosom 10*), un inhibiteur de la voie PI3K-

Akt du récepteur de l'insuline. Tau bloquerait ainsi l'effet inhibiteur de PTEN par séquestration.

La protéine tau est également retrouvée au niveau nucléaire (Metuzals *et al.*, 1988; Loomis *et al.*, 1990; Maina *et al.*, 2016). En effet, la protéine tau déphosphorylée peut être transloquée au noyau après stress cellulaire (Alonso *et al.*, 2010; Sultan *et al.*, 2011). Au sein du noyau, elle est en mesure d'interagir avec la production d'ARN ribosomiaux (Bou Samra *et al.*, 2017) ainsi que d'interagir avec l'ADN dans les régions riches en A et T via le domaine de liaison aux microtubules et le domaine riche en prolines (Hua & He, 2003; Sjoberg, 2006; Rossi *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2015). Elle est également impliquée dans la protection des dommages aux ARN et à l'ADN (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014). Enfin, des travaux sont en cours quant à l'implication de tau dans la régulation de l'expression génique via des modifications de l'épigénome telles que l'acétylation des histones ainsi que dans le maintien de l'hétérochromatine péricentromérique (Chatterjee *et al.*, 2018; Mansuroglu *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2009).

Bien que tau soit principalement retrouvée au niveau de l'axone, elle est également présente dans environ 70% des dendrites (Tai *et al.*, 2012). Aussi, elle peut être libérée dans la fente synaptique de façon dépendante à l'activité neuronale, lui permettant de rejoindre le neurone post-synaptique ou les cellules gliales (Pooler *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2014; Sokolow *et al.*, 2015). Au niveau de la densité post-synaptique, tau interagit avec les AMPAR (Yagishita *et al.*, 2015; Suzuki & Kimura, 2017; Shrivastava *et al.*, 2019) et NMDAR, notamment via l'interaction de tau avec fyn, régulant l'état phosphorylé de la sous-unité NR2B du NMDAR et son adressage à la membrane (Ittner *et al.*, 2010; Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012; Yagishita *et al.*, 2015; Shrivastava *et al.*, 2019). La protéine tau apparaît également comme essentielle pour les effets neuroprotecteurs du BDNF (Chen *et al.*, 2012; Burnouf *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2016a) et les effets synaptotoxiques du peptide A β (Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007; Shipton *et al.*, 2011).

3.5. Fonctions pathologiques de tau

Les différentes fonctions de tau, présentées dans le paragraphe précédent, sont altérées lors de processus pathologiques (Figure 28). Ainsi, sa capacité à lier les microtubules est diminuée lorsque tau est hyperphosphorylée, conduisant à une dépolymérisation des microtubules, et donc une altération du transport axonal (Biernat *et al.*, 1993; Cleveland *et al.*, 1977; Drewes *et al.*, 1995; Hamdane *et al.*, 2003; Sengupta *et al.*, 1998), ainsi qu'une réduction du transport axonal des mitochondries (Rodríguez-Martín *et al.*, 2016). L'hyperphosphorylation et

l'oligomérisation de tau induisent une perte de la fonction protectrice de l'ADN de tau (Alonso *et al.*, 2010; Sultan *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013; Violet *et al.*, 2015). De plus, une relocalisation de tau, dans un état hyperphosphorylé, a été observée, du compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique, conduisant à des altérations synaptiques (Tashiro *et al.*, 1997; Hoover *et al.*, 2010; Zempel *et al.*, 2010). L'hyperphosphorylation ou l'acétylation anormale de tau est associée à des altérations du trafic des récepteurs glutamatergiques (Lau *et al.*, 2016; Tracy *et al.*, 2016) et à une perte des épines dendritiques expliquant les déficits cognitifs liés à la pathologie tau (Muntané *et al.*, 2008; Hoover *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2016; Chatterjee *et al.*, 2018).

De plus, le métabolisme énergétique des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est diminué avec une réduction de l'utilisation du glucose au niveau central (Mosconi *et al.*, 2008; Teune *et al.*, 2010). La déprivation en glucose induit une augmentation de phosphorylation de tau via l'activation de la voie p38 MAPK et est suffisante pour induire des troubles mnésiques (Lauretti & Praticò, 2015; Lauretti *et al.*, 2017). A titre d'exemple, chez les animaux qui hibernent il y a une augmentation de la phosphorylation de tau naturelle déclenchant la formation de structures ressemblant à des filaments appariés en hélice (Planel, 2004; Arendt *et al.*, 2015). Ces modifications sont réversibles sauf lorsque la déprivation en glucose persiste (Arendt *et al.*, 2015). Dans un contexte d'hypométabolisme, la kinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*) est activée et phosphoryle tau directement (Wang *et al.*, 2007; Thornton *et al.*, 2011; Vingdeux *et al.*, 2011; Domise *et al.*, 2016).

Par ailleurs, la protéine tau peut se propager de cellules à cellules, ce qui a été montré dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, le contact synaptique entre les neurones favoriserait la propagation de la pathologie tau *in vitro* (Calafate *et al.*, 2015). Cependant, le mécanisme par lequel la protéine tau serait libérée dans l'espace extracellulaire pour passer d'un neurone à un autre n'est pas encore complètement élucidé. Des travaux ont montré que la majorité de la protéine tau extracellulaire serait sécrétée sous forme libre (Dujardin *et al.*, 2014; Katsinelos *et al.*, 2018; Pooler *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2014) mais elle peut également être sécrétée sous forme vésiculaire (ectosomes et exosomes) (Dujardin *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2014; Asai *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Ces différentes formes de sécrétion ainsi que la formation de nanotubes peuvent permettre le transfert de tau d'une cellule à une autre (Tardivel *et al.*, 2016).

De plus, des travaux ont montré que la protéine tau pathologique induisait le recrutement et l'assemblage de protéine tau sauvage, et également que la pathologie tau se propageait à des régions connectées synaptiquement (Clavaguera *et al.*, 2009). L'existence d'un transfert de

tau pathologique de synapse à synapse a également été montré dans notre laboratoire, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Dujardin *et al.*, 2014). Ces travaux ont permis de formuler l'hypothèse que tau pourrait être une protéine de type prion, adoptant ainsi une conformation tridimensionnelle particulière lui permettant de recruter la protéine tau sauvage et de former des agrégats cellulaires. En outre, ces formes pathologiques seraient capables d'être libérées dans la fente synaptique et ainsi de se transmettre de neurones en neurones, propageant alors la pathologie tau aux régions interconnectées (Alonso *et al.*, 1996; Clavaguera *et al.*, 2009; Fraser, 2014; Holmes & Diamond, 2014; Hu *et al.*, 2016; Sanders *et al.*, 2014; Ayers *et al.*, 2018).

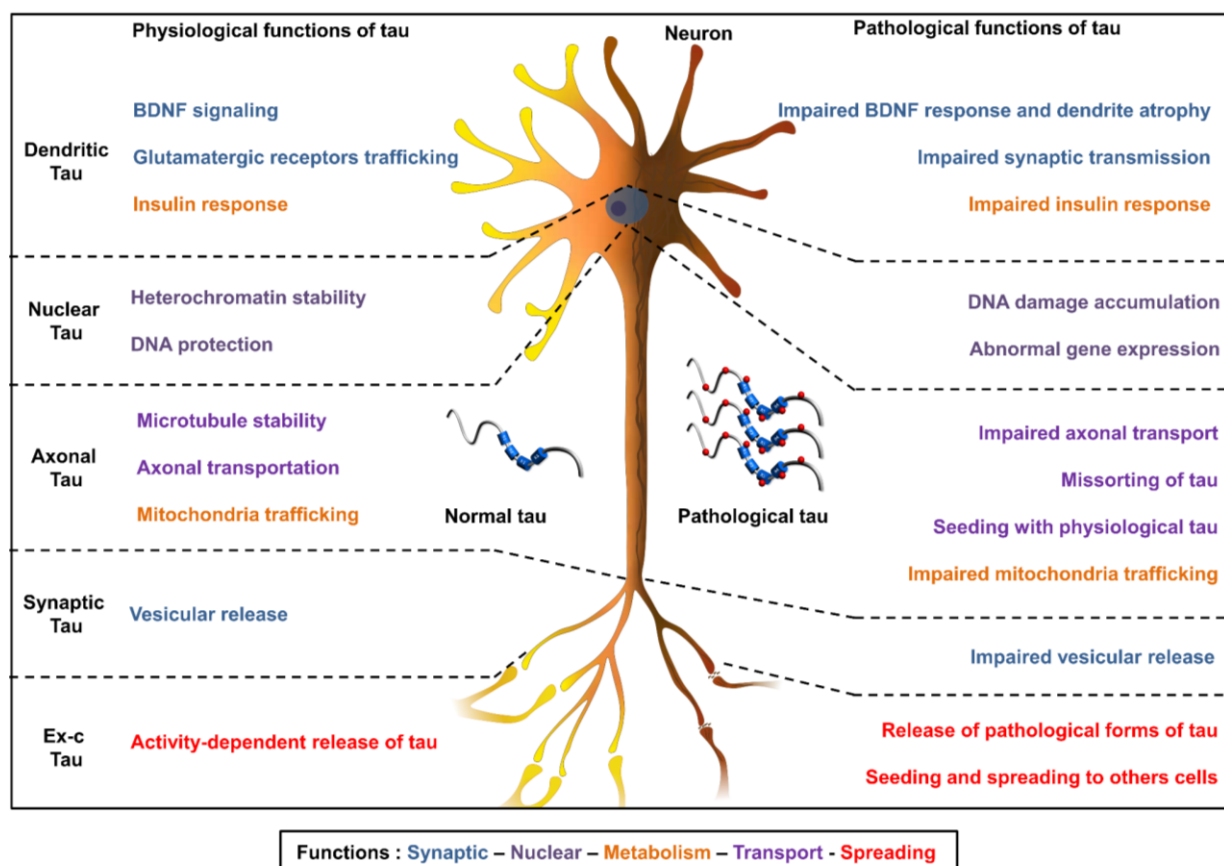


Figure 28 : Fonctions physiologiques et pathologiques de la protéine tau.

3.6. Liens entre la protéine tau et le peptide amyloïde A β

Une relation bidirectionnelle existe entre tau et A β . Il a été montré que A β était en mesure d'augmenter la phosphorylation de tau via l'activation de la signalisation AKT-GSK3 β ou cJun kinase provoquant une hyperphosphorylation de tau (Götz *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2009; Tokutake *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). De plus, la toxicité amyloïde sur la cognition dans le contexte de la maladie d'Alzheimer serait en grande partie due à la

pathologie tau. Cet effet synergique entre tau et A β dépendrait de la kinase Fyn. Celle-ci est impliquée dans l'adressage et le maintien des récepteurs glutamatergiques au niveau post-synaptique, et essentielle pour un bon encodage de l'information (Roberson *et al.*, 2007, 2011; Li & Götz, 2017). A l'inverse, des études plus récentes ont montré que Fyn n'était pas nécessaire à la toxicité d'A β induite par tau (Castillo-Carranza *et al.*, 2015; Ittner *et al.*, 2010; Roberson *et al.*, 2011; Shipton *et al.*, 2011; Vossel *et al.*, 2010).

3.7. La famille des tauopathies

Les tauopathies sont un regroupement de maladies neurologiques humaines chez lesquelles sont retrouvées des inclusions de tau dans les neurones et/ou les cellules gliales, classifiées originellement par Bernardino Ghetti et Michel Goedert (Lebouvier *et al.*, 2017). Les DNF (*neurofibrillary tangle* en anglais) ont été décrites pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer, sur un cerveau de démence présénile. On distingue classiquement les tauopathies primaires qui possèdent des lésions n'impliquant que la protéine tau, et les tauopathies secondaires où l'on retrouve plusieurs types de lésions.

Les tauopathies primaires incluent la tauopathie primaire liée à l'âge (PART) (Crary *et al.*, 2014; Duyckaerts *et al.*, 2015) et les dégénérescences lobaires frontotemporales (Spillantini *et al.*, 1998a) – regroupant plusieurs maladies : la paralysie supranucléaire progressive (PSP) (Boxer *et al.*, 2017), la dégénérescence corticobasale (CBD) (Sergeant *et al.*, 1999), la maladie de Pick (Buée Scherrer *et al.*, 1996), la maladie à grains argyrophiles (Buée-Scherrer *et al.*, 1997; Hof *et al.*, 1992) ainsi que plusieurs formes liées à des mutations du gène *MAPT* (Spillantini *et al.*, 1998a, 1998b). L'inclusion des formes de protéines tau 3R ou 4R au sein des agrégats est différente selon les tauopathies (cf. Tableau 3) (Sergeant *et al.*, 1999) alors que la maladie de Pick est une tauopathie 3R (Buée Scherrer *et al.*, 1996). La maladie d'Alzheimer, est, quant à elle, une tauopathie mixte (3R et 4R). Les lésions dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21 (*down's syndrom*) se caractérisent par la présence conjointe de dégénérescences neurofibrillaires et de dépôts amyloïdes, ce qui en fait des tauopathies secondaires. Ces lésions histologiques de tau touchent à la fois les neurones et les cellules gliales (Figure 29).

Disease	Predominant Tau isoform	Affected cell types	Affected brain regions	Pathology
Pick's disease	3R	Neurons and glia	Frontal, temporal, and parietal lobes; hippocampus	Pick bodies, neuropil threads, ramified astrocytes, and round aggregates
Corticobasal degeneration	4R	Neurons and glia	Frontal and parietal cortices; substantia nigra	Ballooned neurons, pretangles, astrocytic plaques, coiled bodies, and neuritic threads
Progressive supranuclear palsy	4R	Neurons and glia	Frontal cortices, subthalamic nucleus, brain stem	Neurofibrillary tangles, globose tangles, tufted astrocytes, coiled bodies
Globular glial tauopathy	4R	Neurons and glia	Frontal and temporal lobes	Globose oligodendrocyte inclusions
Argyrophilic grain disease	4R	Neurons and glia	Transentorhinal and entorhinal cortices, hippocampus	Argyrophilic grains, oligodendritic coiled bodies, neuronal pretangles
Alzheimer's disease	3R and 4R	Neurons	Entorhinal cortex, hippocampus, cortex	Neurofibrillary tangles, neuropil threads

Tableau 3 : Classification et lésions histologiques des principales tauopathies. Il existe des tauopathies 3R (Pick), 4R (CBD, PSP) et mixte 3R/4R (Alzheimer) (Götz *et al.*, 2019).

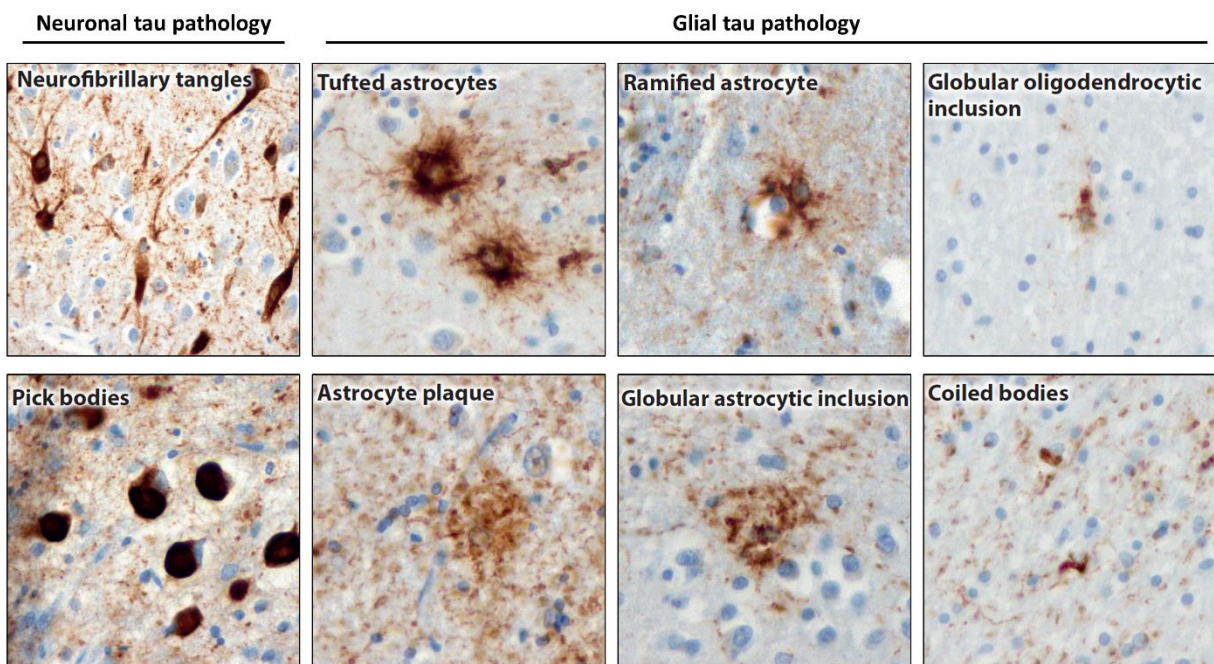


Figure 29 : Lésions histologiques des tauopathies. Les agrégats de tau peuvent être retrouvés dans les neurones ou dans les cellules gliales selon les pathologies (Götz *et al.*, 2019).

4. La neuro-inflammation

4.1. Composante cellulaire

Dans la maladie d'Alzheimer, la neuro-inflammation est considérée comme la troisième composante lésionnelle (Heneka *et al.*, 2015). Celle-ci va mettre en jeu les cellules gliales dans un mécanisme de défense afin de prévenir l'accumulation de tau et d'A β . Toutefois, devant la production continue de ces protéines, la neuro-inflammation devient chronique, passant de neuroprotectrice à neurotoxique. La découverte de nombreux facteurs de risques génétiques de la maladie d'Alzheimer associés à la neuro-inflammation a par ailleurs renforcé son statut d'acteur à part entière dans la progression de la maladie (Karch & Goate, 2015).

4.1.1. Réactivité microgliale

Les cellules microgliales constituent la première ligne de défense du cerveau. Lors de lésion ou de l'entrée d'un agent pathogène, celles-ci vont migrer au site concerné et phagocyter les débris cellulaires et pathogènes. Afin de mener à bien ces fonctions, ces cellules possèdent un ensemble de récepteurs reconnaissant des motifs variés, appelés PRR (*pattern recognition receptors*). Ceux-ci peuvent reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes tels que le LPS, ce sont les PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Ils vont également reconnaître des signatures moléculaires de danger issus des cellules hôtes elles-mêmes, ce sont les DAMPs (*Damage-associated molecular patterns ou danger-associated molecular patterns*). Lorsque ces récepteurs PRR sont activés, une cascade de signalisation s'en suit, activant de facteurs de transcription tels que NF-KB (*nuclear factor-kappa B*) afin d'augmenter l'expression de gènes pro-inflammatoires (Venegas & Heneka, 2017).

Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, les microglies vont être activées de façon chronique par les peptides A β et les protéines tau pathologiques (Maezawa *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2013; Taneo *et al.*, 2015). La protéine tau, sous forme phosphorylée ou non, est capable d'activer les cellules microgliales, induisant alors un profil pro-inflammatoire via l'activation de la voie p38 MAPK (Perea *et al.*, 2018). Contrairement à une entrée de pathogène ou une lésion tissulaire, l'accumulation de ces protéines mal conformées est chronique, induisant une modification fonctionnelle persistante des cellules microgliales. D'un phénotype neuroprotecteur elles vont progressivement évoluer vers un phénotype neurotoxique, signe d'une maladaptation de la neuro-inflammation (Doty *et al.*, 2015; Mizuno, 2012).

Les cellules microgliales réactives sont localisées à proximité des dépôts amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires (Nicoll *et al.*, 2003; Nilson *et al.*, 2017; Zotova *et al.*, 2013). Leur activation progressive au cours de la maladie est également corrélée à l'évolution du déclin cognitif et à la pathologie (Fan *et al.*, 2015; Hamelin *et al.*, 2016; Okello *et al.*, 2009; Ramanan *et al.*, 2015).

4.1.2. Réactivité astrocytaire

Les astrocytes sont aussi retrouvés dans un état réactif et dans la vicinity des lésions (Simpson *et al.*, 2010). L'apparition de ces astrocytes réactifs se fait bien avant l'apparition des lésions histologiques (Carter *et al.*, 2012; Wharton *et al.*, 2009). A la manière des cellules mentionnées précédemment, les astrocytes sont capables de migrer vers les dépôts amyloïdes et d'en favoriser la clairance (Wyss-Coray *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2013). Ainsi, le blocage des astrocytes contribue à accentuer l'accumulation de peptides amyloïdes (Kraft *et al.*, 2013).

Les astrocytes vont subir des remaniements fonctionnels, parmi lesquels la diminution des transporteurs glutamatergiques GLT-1, chargés de recapturer le glutamate synaptique (Simpson *et al.*, 2010), mais également libérer du glutamate en réponse à la stimulation par le peptide A β (Talantova *et al.*, 2013). Ces mécanismes contribueraient à augmenter les niveaux de glutamate extracellulaire, favorisant un contexte d'excitotoxicité, qui constitue par lui-même un facteur pro-inflammatoire (Dai *et al.*, 2010).

La libération de molécules inflammatoires par la microglie, notamment IL-1 α , TNF α et C1qa, va induire un changement phénotypique des astrocytes, d'un profil neuroprotecteur A2 vers un profil neurotoxique A1 (Liddelov *et al.*, 2017; Zamanian *et al.*, 2012). Ces derniers ont été observés, dans plusieurs maladies neurodégénératives : la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Liddelov *et al.*, 2017).

4.1.3. Rétrocontrôle neuronal

En marge des cellules gliales, les neurones sont également en mesure d'exercer un rétrocontrôle sur la réactivité gliale. Cette communication neurone – microglie est médiée par de nombreuses molécules parmi lesquelles on trouve CX3CL1/CX3CR1, CD200/CD200R, CSF1/CSF1R ou encore les voies purinergiques ATP/P2Y et ATP/P2X (Wohleb, 2016). Ainsi, la libération des protéines neuronales CD200 et fractalkine CX3CL1 vont activer leurs récepteurs microgliaux, CD200R et CX3CR1. L'activation de ces derniers va diminuer la réactivité microgliale et favoriser leur survie et leur prolifération (Cardona *et al.*, 2006; Hoek *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2014). Toutefois, au cours de la maladie

d'Alzheimer il semble y avoir une perte de ces deux ligands (Duan *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2009). De plus, il a récemment été montré que tau pouvait se lier de manière compétitive sur le récepteur CX3CR1 et favoriser ainsi sa propre internalisation (Bolós *et al.*, 2017). A l'inverse, plusieurs études suggèrent que ces voies seraient augmentées au cours de la maladie et favoriseraient l'activation anormale des cellules gliales (Luo *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2016; Wohleb *et al.*, 2018). Cela renforce l'idée selon laquelle les interactions neurones – glie vont évoluer tout au long de la maladie d'Alzheimer, et avoir des effets radicalement opposés.

4.1.4. Système immunitaire périphérique

Parmi les facteurs inflammatoires libérés sont retrouvés les chémokines. Ces molécules ont un pouvoir attractant en regard des cellules inflammatoires, au niveau central comme périphérique. Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer est retrouvée une infiltration de différents types de cellules périphériques telles que les cellules *natural killer* (Kelly *et al.*, 2013), les neutrophiles (Zenaro *et al.*, 2015), les macrophages (Fiala *et al.*, 2002) ainsi que les cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes T CD3+/CD8+ cytotoxiques et CD3+/CD4+ « helper » (Itagaki *et al.*, 1988; Laurent *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 1988; Togo *et al.*, 2002). Leurs rôles dans l'évolution de la maladie sont encore mal connus. Toutefois, nous avons montré au laboratoire que la délétion des lymphocytes par immunothérapie était bénéfique vis-à-vis des déficits mnésiques et de la neuro-inflammation dans un modèle de tauopathie (Laurent *et al.*, 2017). A l'inverse, d'autres études ont montré que les lymphocytes T « helper » CD4+ étaient bénéfiques dans ce contexte (Baek *et al.*, 2016; Dansokho *et al.*, 2016). Ces différentes études ouvrent de nouvelles perspectives quant aux pistes thérapeutiques concernant la maladie d'Alzheimer.

4.2. Conséquences pathologiques

La neuro-inflammation, va par elle-même, favoriser à terme le renforcement des processus pathologiques liés à tau et à A β , contribuant directement à la perte neuronale et synaptique.

4.2.1. Sur la pathologie amyloïde

Les cellules gliales vont migrer à proximité des dépôts amyloïdes afin de les phagocyter. Toutefois, l'excès de production de molécules pro-inflammatoires va progressivement réduire leurs capacités à phagocyter, résultant en l'accumulation de peptides amyloïdes A β sous forme de larges dépôts amyloïdes (Koenigsknecht-Talboo & Landreth, 2005; Pan *et al.*, 2011). En outre, l'activation de l'inflammasome NLRP3 (cf. Figure 16 page 54) va résulter en

la production d'IL-1 β mature et favoriser le développement de la pathologie amyloïde et des troubles cognitifs associés (Heneka *et al.*, 2013; Stancu *et al.*, 2019; Tejera *et al.*, 2019).

4.2.2. Sur la pathologie tau

L'activation microgliale contribue également au développement de la pathologie tau (Maphis *et al.*, 2015). Les molécules pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β vont favoriser la voie p38 MAPK et induire l'hyperphosphorylation de tau (Li *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2013; Bhaskar *et al.*, 2010). De même, le TNF α favorise la production de ROS ce qui entraîne aussi l'hyperphosphorylation (Gorlovoy *et al.*, 2009). La microglie et les astrocytes seraient également mis en jeu dans les processus de propagation de la pathologie tau (Perea *et al.*, 2018, 2019). En effet, toutes les deux sont capables d'internaliser des formes solubles et/ou oligomères de tau (Bolós *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2015; Perea *et al.*, 2019; Sanchez-Mejias *et al.*, 2016) et ensuite de les libérer via des exosomes, contribuant ainsi à cette propagation (Rajendran *et al.*, 2014; Polanco *et al.*, 2016). L'inhibition de la biosynthèse d'exosome ainsi que la déplétion de la microglie permet de réduire drastiquement cette propagation dans un modèle murin de tauopathie (Asai *et al.*, 2015; Leyns & Holtzman, 2017).

4.2.3. Sur l'intégrité neuronale et synaptique

Ces différents remaniements gliaux couplés à la production de molécules pro-inflammatoires libérées par les cellules gliales vont profondément altérer le fonctionnement synaptique, jusqu'à provoquer la mort des neurones. Ainsi, au cours de la maladie, les cellules microgliales vont subir une rétractation de leurs prolongements, ce qui va diminuer leurs contacts avec les synapses (Davies *et al.*, 2017). La production de facteurs trophiques et de gliotransmetteurs va également diminuer au profit de la production de molécules pro-inflammatoires (Harada *et al.*, 2016; Parkhurst *et al.*, 2013; Piacentini *et al.*, 2017). Cette première conséquence de l'inflammation va réduire le soutien trophique aux synapses et neurones.

De plus, les médiateurs inflammatoires par eux-mêmes sont capables d'altérer la plasticité synaptique. Expérimentalement, il a été montré que les facteurs TNF α , IL-1 β , NO, IL-6, C3 et CCL3, qui sont tous des facteurs augmentés dans la maladie d'Alzheimer, réduisent les phénomènes de LTP (Lian *et al.*, 2015; Murray & Lynch, 1998; Tancredi *et al.*, 1992, 2000; Tong *et al.*, 2012).

Enfin, les cellules gliales réactives vont être également responsables de la destruction synaptique et neuronale. Une récente étude a d'ailleurs montré que l'élimination de la quasi-

totalité des cellules microgliales dans une souris modèle d'amyloïdogénèse (5xFAD) ne modifiait pas la pathologie amyloïde mais réduisait drastiquement la perte synaptique et la mort neuronale – un phénomène qui est médié par les cellules gliales réactives (Spangenberg *et al.*, 2016). Enfin, l'adoption d'un phénotype neurotoxique A1 par les astrocytes, induit par la microglie, induit également la mort neuronale (Liddelow *et al.*, 2017). Cette neuro-inflammation va donc à travers différents niveaux contribuer à la destruction inéluctable du fonctionnement synaptique et neuronal, contribuant ainsi à l'évolution du déclin cognitif et à la progression de la maladie d'Alzheimer.

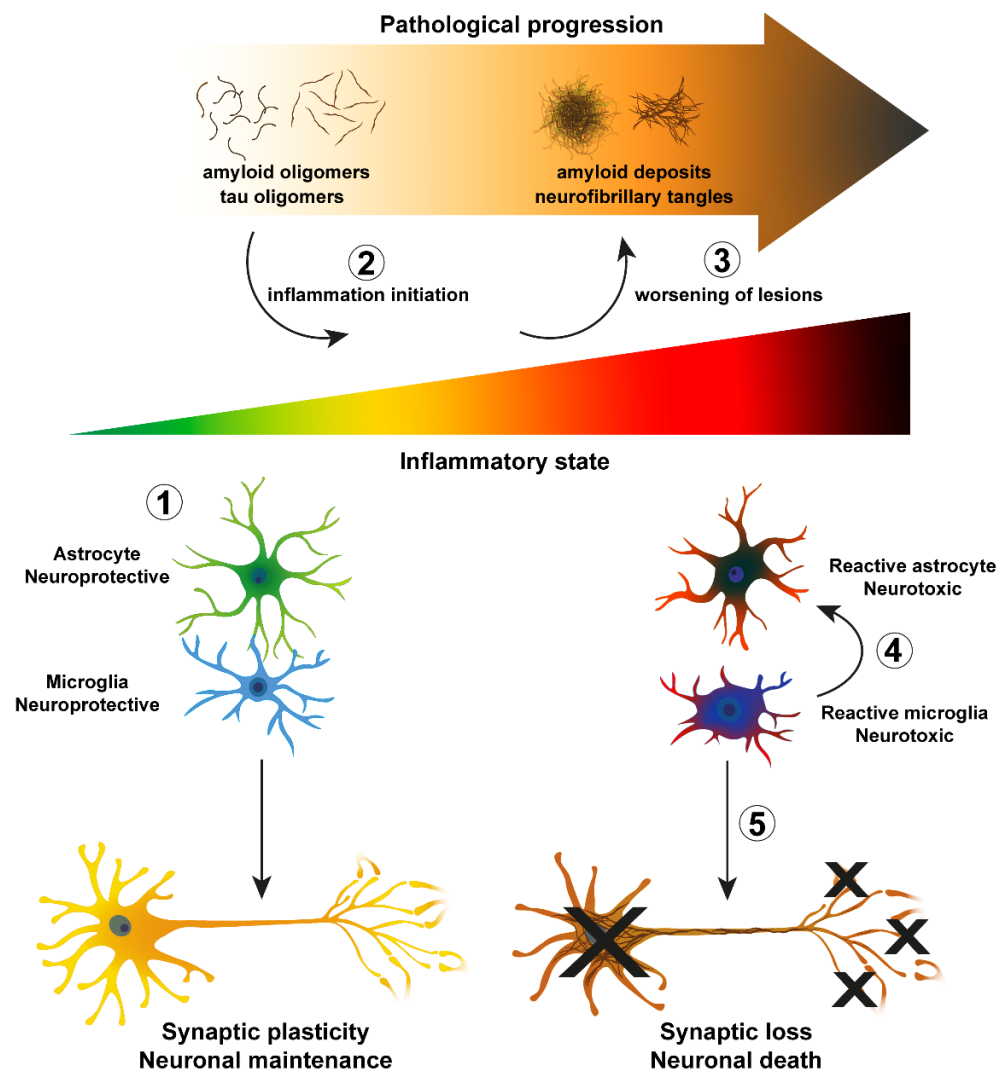


Figure 30 : Cellules gliales en contexte physiologique et lors de la neuroinflammation. (1) Les cellules gliales contribuent au bon fonctionnement neuronal et synaptique ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire. (2) Dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation précocée de formes solubles et oligomériques de tau et d'A β va induire une réponse inflammatoire. (3) Cette réponse va augmenter progressivement, favorisant le développement de la pathologie tau et amyloïde, et (4) favorisant l'adoption d'un phénotype neurotoxique par les cellules gliales. (5) La neuro-inflammation finit par être hors de contrôle et va induire des dommages synaptiques puis neuronaux.

5. Facteurs de risques

La maladie d'Alzheimer apparaît sous deux formes, une forme familiale et une forme sporadique. La forme familiale est liée à la mutation de trois gènes liés au métabolisme du peptide amyloïde β : APP, PS1 et PS2. Ces formes sont rares et apparaissent précocément (Rosenberg *et al.*, 2016). Elles concerneraient moins de 1% des cas.

La forme sporadique représente l'écrasante majorité des cas, dont le facteur de risque principal est l'âge. Son apparition, après 60 ans (Scheltens *et al.*, 2016), est liée à des facteurs de susceptibilité génétiques (Lambert & Amouyel, 2011; Cuyvers & Sleegers, 2016) et environnementaux (Reitz & Mayeux, 2014). Parmi les facteurs génétiques, on retrouve des facteurs impliqués dans le métabolisme des lipides comme le variant $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (Bonham *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2016), mais également des gènes impliqués dans l'inflammation (Fonseca *et al.*, 2016; Guerreiro *et al.*, 2013; Karch & Goate, 2015). Les maladies touchant au métabolisme tels que l'obésité, l'hypertension artérielle ou le diabète de type 2, sont associées à un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer (Alford *et al.*, 2018; Kandimalla *et al.*, 2017; Moonga *et al.*, 2017). Parmi les facteurs protecteurs sont retrouvés les régimes alimentaires de type méditerranéen, pauvre en viande rouge et riche en acides gras mono-insaturés (Aridi *et al.*, 2017). Une activité physique et intellectuelle régulière semble être également un facteur protecteur vis-à-vis de l'apparition de la maladie, et à ce titre les personnes avec un haut niveau d'étude semblent être moins atteints par cette maladie, impliquant potentiellement une réserve cognitive plus importante (Groot *et al.*, 2018). Par ailleurs, depuis une vingtaine d'années, différentes études suggèrent que la consommation de café pourrait réduire le risque de développer la maladie et constituerait une piste thérapeutique intéressante (Eskelinen & Kivipelto, 2010; Flaten *et al.*, 2014). Cet effet bénéfique du café est largement imputé à la caféine, qui est son principal constituant, et qui agit dans l'organisme comme un antagoniste non sélectif des récepteurs à l'adénosine (Cellai *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2018).

Chapitre IV : Caféine, récepteurs adénosinergiques et maladie d'Alzheimer

1. Café et maladie d'Alzheimer

1.1. Café et caféine

Le café et le thé sont les boissons stimulantes les plus consommées par l'Homme. Bien qu'elles contiennent de nombreuses molécules aux effets variés, elles sont particulièrement riches en caféine. A ce titre, la caféine est la molécule psychoactive la plus consommée dans le monde. Historiquement, l'Homme a commencé à boire des boissons caféinisées à différents endroits de par le monde. Les plus anciennes traces remontant à -3000 avant J.C. en Chine avec la consommation des feuilles de théier pour faire le thé (Evans, 1992). En Amérique, les civilisations précolombiennes telles que les Mayas utilisaient les grains de cacao pour faire du chocolat, riche en théobromine et en caféine, dont la plus ancienne trace remonte à -1000 avant J.C. (Henderson *et al.*, 2007). En Afrique, la consommation des noix de cola, contenant une forte teneur en caféine, remonte sans doute à plus longtemps, peut être même à la préhistoire (Goodman *et al.*, 2007). L'arrivée de la caféine en Europe est, elle, beaucoup plus récente, au cours du 17^{ème} siècle et devint très populaire pendant le siècle des lumières, notamment grâce à ses capacités pro-mnésiantes (Fredholm *et al.*, 1999; Borota *et al.*, 2014; Cappelletti *et al.*, 2015). Ainsi, il est intéressant de noter que la consommation de ces boissons caféinées a façonné le développement de nombreuses civilisations humaines.

Chez l'homme, l'action pharmacologique de la caféine est multiple. Elle permet d'inhiber la phosphodiesterase, une enzyme permettant de dégrader l'AMPc et la GMPc, de bloquer les récepteurs GABAergiques de type A et d'induire la libération du calcium depuis les stocks intracellulaires (Fredholm *et al.*, 1999). Ces effets sont dommageables au fonctionnement des cellules, en particulier dans le cerveau. Toutefois, ces effets ne peuvent être obtenus qu'avec des doses de 20 à 100 fois plus élevées que celles consommées usuellement (Figure 31). Dans ces conditions, la caféine va bloquer de manière non sélective les récepteurs à l'adénosine. Comme nous l'avons vu au cours du chapitre I, cela s'explique par la structure très proche entre la caféine et l'adénosine (Figure 32) (Borea *et al.*, 2018). Par exemple, au niveau de la poche hydrophobe du A_{2A}R, on peut noter que l'adénosine et la caféine ne se lient pas exactement au même endroit, provoquant des remaniements structuraux qui, dans le cas de l'adénosine, permettent aux récepteurs de se coupler aux protéines Gs, et dans le cas de la caféine, ne le permettent pas (Carpenter & Lebon, 2017).

A Potency of caffeine at rat and human adenosine receptor subtypes

Receptor subtype	Rat (K_D)	Human (K_D)
	μM	
A ₁ receptors	20	12
A _{2A} receptors	8.1	2.4
A _{2B} receptors	17	13
A ₃ receptors	190	80

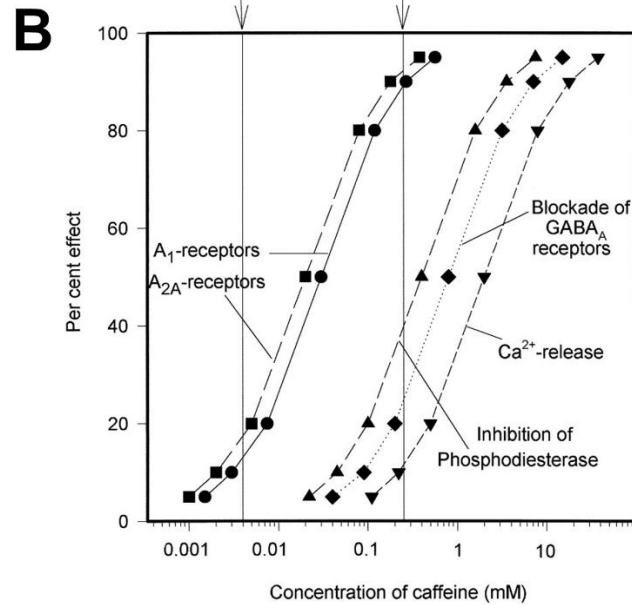


Figure 31 : Structure de la caféine et effets biologiques. (A) Le A_{2A}R est le plus sensible à la caféine parmi les quatre récepteurs adénosinergiques. (B) La caféine est capable de bloquer les récepteurs A₁ et A_{2A}, même à une concentration basse, obtenue après une tasse de café. L'inhibition de la phosphodiésterase, le blocage des récepteurs GABA et la mobilisation des stocks de calcium nécessitent, respectivement, des concentrations 20, 40 et 100 fois supérieures de caféine. La quantité de caféine nécessaire à ces trois effets est impossible à atteindre avec une consommation normale de boissons caféinées (Fredholm *et al.*, 1999).

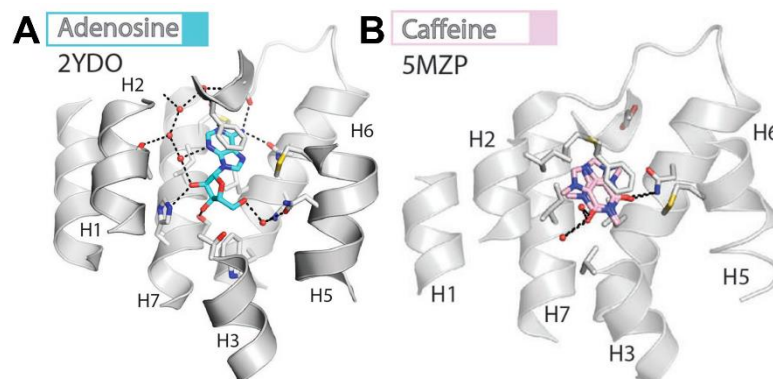


Figure 32 : Adénosine et caféine interagissant avec le récepteur A_{2A}. Sites d'interactions respectifs de l'adénosine (A, référence PDB : 2YDO) et de la caféine (B, référence PDB : 5MZP) (Carpenter & Lebon, 2017).

Chez l'adulte, la caféine a des effets bénéfiques sur l'humeur, l'attention et le traitement de l'information (Sawyer *et al.*, 1982; Fredholm *et al.*, 1999, 2005b; Smit & Rogers, 2000; Lorist & Tops, 2003; Fisone *et al.*, 2004; Haskell *et al.*, 2005). Plus particulièrement, elle favorise l'excitabilité neuronale dans le néocortex (Kerkhofs *et al.*, 2018) et la consolidation de la mémoire (Borota *et al.*, 2014). De part sa consommation mondiale et ses effets procognitifs, de nombreuses études se sont intéressées à ses bienfaits sur le vieillissement et les maladies neurodégénératives.

1.2. Effets bénéfiques du café sur la maladie d'Alzheimer

Depuis une vingtaine d'années, différentes études épidémiologiques ont suggéré que la consommation de café pourrait réduire le déclin cognitif lié au vieillissement et aux maladies neurodégénératives (Flaten *et al.*, 2014; Cellai *et al.*, 2018). Au début des années 2000, une étude rétrospective de Maia & de Mendonça (2002) a montré une corrélation inverse entre la consommation de caféine et l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, les patients atteints de cette maladie ont consommé environ 75 mg de caféine par jour durant les 20 ans précédents le diagnostic contre 200 mg pour les sujets âgés contrôles. Une deuxième étude, cette fois prospective, de Ritchie *et al.* (2007) sur 7000 participants a révélé que les femmes âgées de plus de 65 ans consommant plus de 3 tasses de café par jour présentaient un moindre déclin de leurs capacités à retrouver des mots et une meilleure mémoire visuospatiale que les femmes âgées buvant seulement une tasse de café ou moins par jour – ce qui ne fut pas retrouvé chez les hommes âgés. Par la suite, une autre étude longitudinale d'Eskelinen *et al.* (2009) a montré que dans une population adulte une consommation quotidienne de caféine allant de 3 à 5 tasses de café par jour, était associée à un risque moindre d'environ 65% de développer une maladie d'Alzheimer ou autre démence par rapport aux personnes consommant moins de caféine. Une méta-analyse de Santos *et al.* (2010) combinant les résultats de 11 études suggèrent également une corrélation inverse entre la consommation de caféine et le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Toutefois, d'autres études n'ont pas observé cet effet. L'étude présentée par Gelber *et al.* (2011) ne montre pas de corrélation entre la consommation de caféine et le risque de démence ou d'altérations cognitives. Par ailleurs, les auteurs rapportent qu'une consommation quotidienne et importante de caféine (supérieures à 277 mg par jour), est associée à une diminution de l'atrophie hippocampique et des lésions cérébrales. Toutefois, il a aussi été montré que la caféine pouvait être délétère concernant les symptômes comportementaux et psychologiques associés aux démences (Baeta-Corral *et al.*, 2018). De plus, il a été montré que d'autres molécules présentes dans le

café peuvent également être bénéfiques vis-à-vis des troubles cognitifs (Cao *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013; Basurto-Islas *et al.*, 2014; Travassos *et al.*, 2015; Low *et al.*, 2019). Ces travaux suggèrent que la caféine seule ne peut être tenue responsable de l'intégralité des effets bénéfiques observés. En définitive, l'ensemble de ces résultats suggère que la consommation régulière de café pourrait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'apparition et du développement de la maladie d'Alzheimer (Cellai *et al.*, 2018).

2. Caféine et modèles de la maladie d'Alzheimer

Suite à ces études épidémiologiques, de nombreux travaux ont été réalisés chez des modèles animaux de cette maladie afin de mieux comprendre l'impact de la caféine dans ce contexte.

2.1. Effets de la caféine sur la pathologie amyloïde

Tout d'abord, les travaux d'Arendash *et al.* ont montré qu'une dose de caféine inférieure à 10 μ M réduisait la production d' $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$, *in vitro*, dans un modèle de neuroblastomes murins (N2A) surexprimant l'APPsw (mutée pour favoriser la voie amyloïdogénique) (Arendash *et al.*, 2006). De manière intéressante, la consommation de caféine de façon « préventive », de 4 à 9,5 mois, avec une dose de 300 mg/l de caféine (comparable à une consommation de 500 mg par jour chez l'homme), réduit le déclin de la mémoire de travail et de la mémoire spatiale ainsi que les niveaux de peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ dans l'hippocampe de souris transgéniques APPsw. A un stade tardif (18-19 mois), un traitement « curatif » à la caféine pendant 4 à 5 semaines est suffisant pour restaurer la mémoire et réduire les formes solubles et agrégées d' $A\beta$ dans l'hippocampe et le cortex entorhinal de ces souris (Arendash *et al.*, 2006, 2009). Par ailleurs, une autre étude a montré que le traitement à long terme de souris APPsw et APPsw/PS1dE9 avec de la caféine réduit également les niveaux plasmatiques d' $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ (Cao *et al.*, 2011).

2.2. Effets de la caféine sur les modèles de pathologie tau

Faisant suite aux travaux réalisés sur la pathologie amyloïde, plusieurs études, notamment celles du laboratoire, ont mis en évidence les effets bénéfiques de la caféine sur la pathologie tau. En effet, une étude *in vitro* a montré que la caféine diminuait la phosphorylation de tau dans une culture de neuroblastome (SH-SY5Y) au niveau des épitopes Ser202/Thr205 (AT8), Ser199/Ser202/Thr205 (Tau-1) et Thr231 (Currais *et al.*, 2011). Également, le traitement de

lapins nourris avec un régime riche en cholestérol (modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer sporadique) avec une dose faible ou haute de caféine (5 et 30 mg de caféine par jour, correspondant à 60mg par jour chez l'homme) permet une réduction de la phosphorylation de tau au niveau de l'épitope Ser396/Ser404 (PHF-1) (Prasanthi *et al.*, 2010). Dans notre laboratoire, l'effet de la caféine a été évalué sur un modèle murin développant une pathologie tau progressive associée à des troubles cognitifs et une neuroinflammation chronique, la souris THY-Tau22. Ces dernières ont été traitées avec de la caféine de façon chronique (300 mg/l) (comparable à une consommation de 500 mg par jour chez l'homme). Ce traitement prévient l'apparition des troubles mnésiques, réduit la phosphorylation et la protéolyse de tau ainsi que la neuroinflammation hippocampique dans ce modèle (Laurent *et al.*, 2014).

3. A_{2A}R et modèles de la maladie d'Alzheimer

Les effets de la caféine dans la maladie d'Alzheimer ont été imputés principalement au blocage des récepteurs A_{2A}. De manière intéressante, l'effet bénéfique de la caféine dans les modèles de pathologie tau ou amyloïde est reproduit par le blocage sélectif (pharmacologique et génétique) des A_{2A}Rs (Cunha *et al.*, 2008; Dall'Igna *et al.*, 2003, 2007; Faivre *et al.*, 2018; Laurent *et al.*, 2016; Orr *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Viana da Silva *et al.*, 2016).

3.1. Effets bénéfiques du blocage du A_{2A}R sur la pathologie amyloïde

Le blocage, pharmacologique ou génétique, du A_{2A}R est bénéfique vis-à-vis de la toxicité synaptique et des troubles mnésiques induits par le peptide amyloïde A β (Dall'Igna *et al.*, 2003, 2007; Canas *et al.*, 2009a). De façon similaire, de récents travaux ont montré que de courts traitements (entre une et trois semaines) avec un antagoniste sélectif du A_{2A}R (SCH58260 par i.p. ou KW6002 p.o.) permettaient de réduire les altérations mnésiques dans deux modèles murins d'amyloïdogénèses (APPsw/PS1dE9 et hAPP-J20) (Viana da Silva *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Orr *et al.*, 2018). Le blocage chronique du A_{2A}R à long terme, de 3 à 9-10 mois, dans le modèle APPsw/PS1dE9, a été évalué dans notre laboratoire et a également montré une amélioration de la mémoire spatiale avec un effet modéré sur la charge amyloïde au niveau cortical (Faivre *et al.*, 2018). Dans ce sens, plusieurs études suggèrent également que le A_{2A}R pourrait avoir un contrôle sur la production de peptide A β (Lu *et al.*, 2016; Nagpure & Bian, 2014). Enfin, il a été démontré dernièrement que la toxicité

synaptique liée au peptide amyloïde impliquait une augmentation de l'expression du A_{2A}R et de CD73, favorisant la suractivation du A_{2A}R (Gonçalves *et al.*, 2019b).

3.1. Effets bénéfiques du blocage du A_{2A}R sur la pathologie tau

Plusieurs travaux, dont ceux du laboratoire, ont également montré que le blocage pharmacologique ou génétique du A_{2A}R améliorait les déficits cognitifs et la pathologie dans les modèles de tauopathies. De même que pour la caféine (Laurent *et al.*, 2014), le blocage génétique ou pharmacologique du A_{2A}R chez les souris THY-Tau22 réduit les déficits mnésiques, la pathologie tau et la neuroinflammation associée (Laurent *et al.*, 2016). Par ailleurs, lors de lésions cérébrales induites par traumatisme crânien, le blocage du A_{2A}R permet de réduire les déficits cognitifs précoces et de diminuer l'hyperphosphorylation de tau (Zhao *et al.*, 2017a, 2017b).

Ces différentes études montrent que le blocage du A_{2A}R est bénéfique tant bien sur les troubles cognitifs liés à tau et A β que sur la pathologie elle-même. Toutefois, de par leur expression ubiquitaire, ces techniques globales ne permettent pas de comprendre par quels mécanismes le A_{2A}R est délétère au cours de la maladie d'Alzheimer.

4. A_{2A}R, vieillissement et maladie d'Alzheimer

4.1. A_{2A}R et vieillissement

Nous l'avons vu au cours du chapitre III, le vieillissement est le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, il a été montré que le système adénoenergique était atteint lors du vieillissement, tant au niveau de l'expression et/ou de la distribution des récepteurs adénoenergiques qu'au niveau des enzymes régulant la concentration d'adénosine extracellulaire (Cunha *et al.*, 1995; Canas *et al.*, 2009b; Crooke *et al.*, 2017). La dysrégulation du récepteur à l'adénosine A_{2A} a été montrée suffisante pour induire des troubles cognitifs liés à l'âge (Cunha 2016). Plusieurs études ont décrit de façon consistante l'augmentation de la densité et de la fonctionnalité du A_{2A}R dans l'hippocampe et le cortex d'animaux âgés, intervenant dans les terminaisons nerveuses glutamatergiques (Canas *et al.*, 2009b; Costenla *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 1995; Diógenes *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 1999; Rebola *et al.*, 2003). Il a également été montré récemment par nos collaborateurs que la surexpression neuronale du A_{2A}R dans l'hippocampe d'individus âgées était plus importante chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Temido-Ferreira *et al.*, 2018). De façon intéressante, l'augmentation de la signalisation neuronale du A_{2A}R chez le rat récapitule un

phénotype de type vieillissement, caractérisé par un dysfonctionnement de l'axe corticotrope (ou axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien), une altération de la plasticité synaptique et des déficits de mémoire (Batalha *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015a; Batalha *et al.*, 2016; Temido-Ferreira *et al.*, 2018).

Au cours du vieillissement, la pathologie tau présente dans le lobe temporal des patients âgés corrèle avec l'apparition du déclin mnésique (Duyckaerts *et al.*, 2015; Josephs *et al.*, 2017). Dans la maladie d'Alzheimer, la progression de la pathologie tau du cortex entorhinal vers l'hippocampe puis vers le néocortex correspond à la progression des symptômes cliniques (Duyckaerts *et al.*, 1997; Grober *et al.*, 1999; Jucker & Walker, 2013), suggérant un rôle central de tau dans le développement des déficits cognitifs. Cependant, la façon dont la pathologie tau induit ces troubles cognitifs est encore mal comprise.

Le lien entre la signalisation adénosinergique du A_{2A}R et la pathologie tau demeure très mal connu. Une précédente étude a rapporté une augmentation significative de l'expression du A_{2A}R ainsi que de sa signalisation dans le cortex frontal des patients atteints de la maladie de Pick, une tauopathie pure (Albasanz *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude a révélé une corrélation entre le niveau d'expression du A_{2A}R, les stades de Braak et les troubles cognitifs chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Orr *et al.*, 2015), suggérant que l'augmentation des niveaux du A_{2A}R en lien avec tau puisse contribuer au développement des troubles cognitifs dans les tauopathies.

4.2. Dysrégulation cellulaire du A_{2A}R au cours de la maladie d'Alzheimer

La dysrégulation du A_{2A}R au cours de la maladie d'Alzheimer pourrait expliquer l'effet bénéfique de la caféine. Récemment, un polymorphisme du gène du A_{2A}R, *ADORA2A*, a été associé à une atrophie de l'hippocampe dans les atteintes cognitives légères et la maladie d'Alzheimer (Horgusluoglu-Moloch *et al.*, 2017), mais aucun polymorphisme de A₁R en ce sens n'a été décrit. De plus, l'expression du A_{2A}R est augmentée dans les neurones et les astrocytes au cours de la maladie d'Alzheimer (Albasanz *et al.*, 2008; Orr *et al.*, 2015, 2015; Temido-Ferreira *et al.*, 2018). Plus récemment, l'augmentation d'expression du A_{2A}R a également été observée dans de nombreux modèles murins de la maladie d'Alzheimer, à la fois au niveau neuronal (Viana da Silva *et al.*, 2016; Temido-Ferreira *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018) et astrocytaire (Faivre *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Orr *et al.*, 2015, 2018). Dans ce contexte, bloquer A_{2A}R pourrait être une piste thérapeutique pertinente.

De façon intéressante, l'activation du A_{2A}R par des approches pharmacologique est suffisante pour promouvoir des déficits de mémoire (Pereira *et al.*, 2005; Pagnussat *et al.*,

2015). D'une part, l'augmentation du A_{2A}R neuronal ou son activation sélective est suffisante pour promouvoir des déficits de plasticité et de mémoire dans l'hippocampe (Giménez-Llort *et al.*, 2007; Batalha *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015a; Batalha *et al.*, 2016; Temido-Ferreira *et al.*, 2018). D'autre part, l'activation sélective du A_{2A}R astrocytaire est également suffisante pour favoriser l'apparition de déficits synaptiques hippocampiques (Orr *et al.*, 2015). En somme, la dysrégulation neuronale ou astrocytaire du A_{2A}R semble suffisante et propice à induire des troubles de la mémoire. Toutefois, leurs impacts relatifs sur le développement des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et les troubles cognitifs associés n'ont pas été évalués à ce jour.

OBJECTIFS DE LA THESE

Notre hypothèse de travail est que le récepteur adénosinergique A_{2A} astrocytaire et neuronal jouerait un rôle important dans le développement des trois composantes lésionnelles de la maladie d'Alzheimer, à savoir la pathologie tau, la pathologie amyloïde et la neuroinflammation, favorisant ainsi l'apparition des troubles cognitifs associés.

Les objectifs de ma thèse sont de mieux comprendre les conséquences de la surexpression des récepteurs adénosinergiques A_{2A} dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Plus particulièrement, il a été montré qu'au cours de cette maladie, les récepteurs A_{2A} sont surexprimés et activés dans deux types cellulaires distincts : les neurones et les astrocytes. De plus, l'augmentation de l'expression de ces récepteurs corrèle avec le développement des lésions et du déclin cognitif.

Afin d'induire une augmentation sélective du A_{2A}R neuronal, nous avons utilisé un nouveau modèle de surexpression conditionnelle du récepteur A_{2A} dans les neurones. Nous avons ensuite croisé ce modèle avec des souris THY-Tau22, développant une pathologie tau progressive afin d'évaluer les conséquences de ce gain de fonction du A_{2A}R sur le développement de la pathologie et des troubles cognitifs associés. Nous avons également exploré dans plusieurs autres tauopathies humaines l'expression du A_{2A}R afin de déterminer si l'augmentation du A_{2A}R en lien avec tau était exclusive à la maladie d'Alzheimer. Enfin, nous avons mis en perspective nos résultats avec ceux obtenus en croisant notre modèle transgénique de surexpression neuronale du A_{2A}R avec la souris APP^{sw}/PS1^{dE9}, développant une pathologie amyloïde progressive.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de comprendre le rôle du A_{2A}R au niveau astrocytaire. Dans un premier temps, nous avons évalué dans un modèle *in vitro* les conséquences transcriptomiques de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé notre nouveau modèle de surexpression conditionnelle des récepteur A_{2A} dans les astrocytes et nous l'avons croisé avec les souris THY-Tau22, afin de déterminer leurs impacts spécifiques vis-à-vis du développement de la pathologie tau et de ses conséquences.

MATERIELS ET METHODES

1. Expériences réalisées sur tissus humain

1.1. Echantillons de cerveaux *post mortem*.

Les cerveaux *post mortem* ont été obtenus grâce aux banques de cerveaux des centres médicaux de Lille (France), Paris (France) et Genève (Suisse), après avoir reçu les autorisations des institutions locales et fourni un consentement écrit et éclairé par la famille du donneur. Nous avons utilisé des échantillons de cortex temporal de trois patients atteints de dégénérescence lobaire fronto-temporale liée à une mutation du gène de tau, *MAPT* P301L (FTLD-tau) (Forrest *et al.*, 2018) et de trois sujets contrôles d'âges similaires (groupe A) obtenus à partir de la neurobanque NEUROCEB. Nous avons également utilisé des échantillons de cortex frontal (aire de Brodmann 10) de 10 patients atteints de FTLD-tau sporadique (cinq dégénérescences cortico-basales (« CBD ») et cinq maladies de Pick (« Pick ») ainsi que neuf autres sujets contrôles d'âges similaires (groupe B), obtenus à partir des neurobanques de Lille, Paris et Genève. Les sujets contrôles ont été définis comme des individus sans signe de déclin cognitif, sans antécédent d'accident vasculaire cérébral et sans pathologie cérébrale chronique, ainsi qu'avec un stade de Braak inférieur ou égal à 2. Tous les patients ont été diagnostiqués par des pathologistes entraînés. Les âges des individus malades et des sujets contrôles ne varient pas significativement (FTLD-tau P301L : $58 \pm 7,5$ ans, groupe contrôle A : 65 ± 6 ans, $p=0,5$, test de Student, moyenne \pm sem / patients CBD : $75 \pm 1,8$ ans ; patients Pick : $66,8 \pm 1,8$ ans ; groupe contrôle B : $75 \pm 3,9$ ans, $p>0,5$, One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey ; moy \pm sem). Les différents groupes d'individus sont également similaires en termes de délai *post mortem* (FTLD-tau P301L : $18 \pm 9,8$ heures ; groupe contrôle A : $22 \pm 7,5$ heures, $p=0,78$, test de Student, moyenne \pm sem / patients CBD : $15,8 \pm 5$ heures ; patients avec la maladie de Pick : $15,7 \pm 2,9$ heures, groupe contrôle B : $18,3 \pm 6,1$ heures, $p>0,5$, One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey, moyenne \pm sem). La plupart des participants et des méthodes ont été décrits et utilisés dans une étude précédente réalisée au sein du laboratoire (Huin *et al.*, 2016). Le tissu de matière grise frais et congelé d'environ 100 mg, récupéré à l'autopsie et stocké à -80°C , a été utilisé afin de réaliser des immuno-empreintes et des PCR quantitatives (qPCR). Un morceau de matière grise issu du cortex temporal a été fixé au formalin et inclus en paraffine puis utilisé pour l'immunohistologie sur des sections d'épaisseur de $8\mu\text{m}$.

1.2. Procédures biochimiques pour tissu humain

Le tissu humain a été homogénéisé avec un tampon Tris contenant 10 % de sucrose dans un broyeur de tissus de type Potter-Elvehjem en verre borosilicaté avec un pilon en PTFE. L'homogénat a ensuite été soniqué sur glace et homogénéisé à 4°C pendant une heure. Les homogénats ont été gardés à -80°C jusqu'à utilisation. Leurs concentrations protéiques ont été déterminées en utilisant un dosage basé sur l'acide bicinchonique (BCA ; Pierce) puis les échantillons ont été dilués dans un tampon de lithium dodécyl sulfate (LDS) supplémenté en agents réducteurs (Invitrogen) et ensuite séparés sur un gel Criterion Bis-Tris 12 %. Les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF, qui a ensuite été saturée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 5 % dans du TNT (Tris 15 mM pH 8, NaCl 140 mM, Tween 0,05 %) et incubée à 4°C pendant 24 heures avec les anticorps primaires (Tableau 4). Après rinçage, les membranes ont été incubées en présence d'un anticorps secondaire (IgG (H+L) couplé à une activité peroxydase HRP (horseradish peroxidase) en fonction de l'anticorps primaire : anti-souris, anti-lapin (PI-2000 et PI-1000 respectivement, Vector Laboratories) ou anti-cochon d'inde (A7289, Sigma-Aldrich) pendant 45 minutes à température ambiante et le signal a ensuite été visualisé via un kit de chimioluminescence (ECL, Amersham Bioscience) et un système d'imagerie LAS4000 (Fujifilm). Les résultats ont été normalisés sur l'actine et la quantification a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ.

1.3. Immunohistofluorescence sur tissu humain

Les coupes de 8 µm ont été déparaffinées avec des bains successifs : 3 x 5 minutes dans du toluène, 5 minutes dans de l'éthanol 100%, 5 minutes dans de l'éthanol 95%, 5 minutes dans de l'éthanol 70% puis 5 minutes dans du tampon phosphate salin (PBS). Le démasquage antigénique a été réalisé sur des sections déparaffinées avec un tampon éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Tween20 0,05 %, pH 9) et bouillies pendant 10 min au micro-onde. Le tissu a été perméabilisé avec une solution de Triton X-100 0,2 % pendant 10 minutes. La liaison non spécifique des anticorps est bloquée en incubant les coupes dans du BSA à 4 % pendant deux heures à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées à 4°C pendant deux jours avec un anticorps primaire de lapin anti-hA_{2A}R (fourni par le Dr. Chern ; Lai *et al.* 2018) dilué dans un sérum normal de chèvre (1/100 ; S1000, Vector Laboratories). Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre Alexa Fluor 568 anti-lapin (1/200 ; A11011, Life Technologies) pendant une heure à température ambiante. Après rinçage avec du PBS, les coupes ont été incubées avec du sérum de chèvre (1/100 ; S1000, Vector Laboratories) pendant une heure et ensuite

avec un anticorps primaire de souris anti-AT8 (1/500 ; MN1020, ThermoFisher) pendant 24 heures à 4°C. Ensuite, l'anticorps secondaire de chèvre Alexa Fluor 488 anti-souris (1/500 ; A11001, Life Technologies) a été appliqué pendant une heure à température ambiante. Les noyaux cellulaires ont été marqués par le 4',6'-diamino-2-phénylindole (DAPI) (1/500 ; 62248, Thermofisher) pendant 10 minutes. Les coupes ont ensuite été incubées dans un tampon de noir soudan (2160, Millipore) pendant 10 minutes afin de réduire l'auto-fluorescence des tissus. Des images en Z-stack ont été acquises sur un microscope confocal Zeiss LSM 710 équipé d'un objectif 40X. La reconstruction en trois dimensions des images a été réalisée en utilisant le logiciel Imaris (Bitplane, USA). La quantification de l'intensité du signal A_{2A}R avec le marquage cellulaire AT8 positif ou négatif a été réalisée sur des coupes de patients FTLD-tau et contrôles du même âge en utilisant le module Cell d'Imaris (Bitplane, USA). L'analyse a été réalisée sur 9 à 11 images reconstruites en 3D par individus, pour un total de 30 images par groupe expérimental.

2. Expériences réalisées sur les modèles murins de tauopathies

2.1. Modèles murins utilisés

2.1.1. Génération d'un modèle inducible du A_{2A}R (lignée TRE-A_{2A}R)

Une séquence d'ADN complémentaire optimisée du A_{2A}R de 410 acides aminés flanquée en 5' d'un site de restriction ClaI et d'une séquence consensus Kozak (GCCACC ; Kozack, 1987) et en 3' d'une séquence WPRE (l'élément de réponse du virus hépatique Woodchuk ; numéro d'accès GenBank : J04514) et le site de restriction EcoRV a été générée par GeneArt (nommée 11AASNZc-mAdora2a). Cette séquence de 1843 paires de bases a été insérée dans un vecteur modifié pTRE-Tight-BI-AcGFP1 (Clontech) sur le site ClaI-EcoRV ; la modification du vecteur a consisté à ajouter un site de restriction HindIII en position 2522. Le fragment du transgène (4671bp) obtenu après digestion HindIII-VspI incluant les séquences suivantes : signal polyA SV40, le gène AcGFP1, le promoteur bidirectionnel inducible Ptight-tet responsive, le gène 11AASNZC-mAdora2a. Ce fragment a été utilisé pour une injection pronucléaire standard dans une lignée C57BL6/6N (SEAT, UPS44, CNRS, Villejuif, France). Le génotypage a été réalisé par PCR en utilisant les primers suivants : sens : 5'-ACACAGGAACACCAGGAAGG-3', et antisens : 5'-CAACACCACGGAATTGTCAG-3' permettant l'amplification d'un fragment de 492 paires de bases. La lignée fondatrice sélectionnée a ensuite été croisée avec des C57BL6/J pendant 10 générations.

2.1.2. Modèle murin de surexpression neuronale et astrocytaire du A_{2A}R

Tous les animaux ont été élevés et maintenus par groupe de 5 à 6 individus dans des cages ventilés au sein d'une animalerie exempte d'organisme pathogène spécifique (EOPS) avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, à une température de 22°C ainsi qu'un accès *ad libitum* à la nourriture (SafeA04) et à l'eau. L'hébergement et les expériences ont été réalisées en accord avec les standards européens pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoires, et les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique animal local (accord 12787-2015101320441671 v9 du CEEA75, Lille, France). La surexpression du récepteur A_{2A} (A_{2A}R) neuronal ou astrocytaire a été obtenue en croisant la lignée transgénique TRE-A_{2A}R (dans lequel le A_{2A}R murin est placé sous contrôle d'un élément de réponse), qui a été développée au laboratoire, avec (i) une lignée transgénique CaMKII-tTA, exprimant la protéine transactivatrice de la tétracycline (tTA) sous contrôle d'un promoteur neuronal spécifique (B6.Cg-Tg(Camk2a-tTA)1Mmay/DboJ;SN 7004; The Jackson Laboratories) ; ou (ii) avec une lignée GFAP-tTA, exprimant le tTA sous contrôle d'un promoteur astrocytaire spécifique.

La protéine transactivatrice tTA a précédemment été associée à une atrophie de l'hippocampe dans une lignée de souris non-C57BL6 (Han *et al.*, 2012). En accord avec cette étude, l'évaluation morphologique de l'hippocampe marqué par du crésyl violet n'a pas révélé de modification chez les souris CaMKII-tTA et GFAP-tTA par rapport aux souris WT, dans la CA1 et le gyrus denté (Figure 33 et données non montrées). Le promoteur CaMKII induit une expression spécifiquement dans les neurones à bas niveau à la naissance avec une augmentation significative entre les 7^{ème} et 25^{ème} jours après la naissance (Kelly *et al.*, 1987; Scholz *et al.*, 1988; Burgin *et al.*, 1990). Le promoteur GFAP induit quand à lui une expression dans les astrocytes avec toutefois une expression dans les niches neurogéniques (Garcia *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 1994). Sachant que la signalisation adénosinergique jouerait un rôle durant le développement du cerveau (Rodrigues *et al.*, 2018), l'expression du transgène A_{2A}R a été bloquée par la consommation de doxycycline dans l'eau de boisson (0,2 mg/ml, 2,5 % de sucrose) de l'accouplement jusqu'au sevrage des petits. La doxycycline est une tétracycline qui a des effets anti-inflammatoires, ce qui a été notamment observé dans un modèle de la maladie d'Alzheimer (Balducci *et al.*, 2018; pour revue Blum *et al.*, 2004). Etant donné que ce modèle nécessitait d'être croisé avec des souris modèles de la maladie d'Alzheimer, développant une pathologie progressive associée à une neuroinflammation (Laurent *et al.*, 2017), nous avons voulu vérifier que le traitement périnatal avec la doxycycline n'interférait pas avec le développement d'une neuroinflammation induite à l'âge

adulte. A cette fin, nous avons analysé la réponse inflammatoire 24 heures après injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS 0, 1 ou 5 mg/kg, dilué dans du PBS, L4391 Sigma) dans l'hippocampe de souris C57BL6/J âgées de deux mois et traitées à la doxycycline jusqu'au sevrage et leurs contrôles de portée. Alors que l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires (tels que Il1b, Tnfa et Ccl3) a été trouvée significativement augmentée dans l'hippocampe 24 heures après l'injection de LPS, le traitement à la doxycycline durant la période prénatale n'a pas modulé le développement de la neuroinflammation induite par le LPS à l'âge adulte (Figure 34).

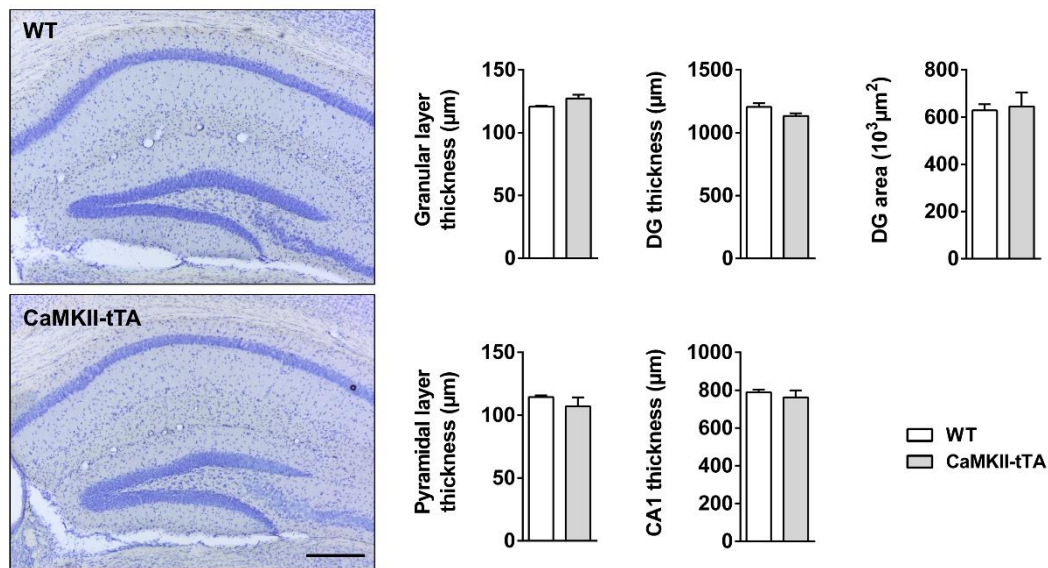


Figure 33 : Effet de la protéine tTA neuronale sur l'intégrité de l'hippocampe des souris CaMKII-tTA. Un marquage au crésyl violet n'a révélé aucune différence morphologique (épaisseur de couche granulaire, de la couche pyramidale, de la CA1 et du gyrus denté (DG) ainsi que la surface du gyrus denté) entre les souris WT et CaMKII-tTA. N = 3 par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem. Echelle = 500 µm.

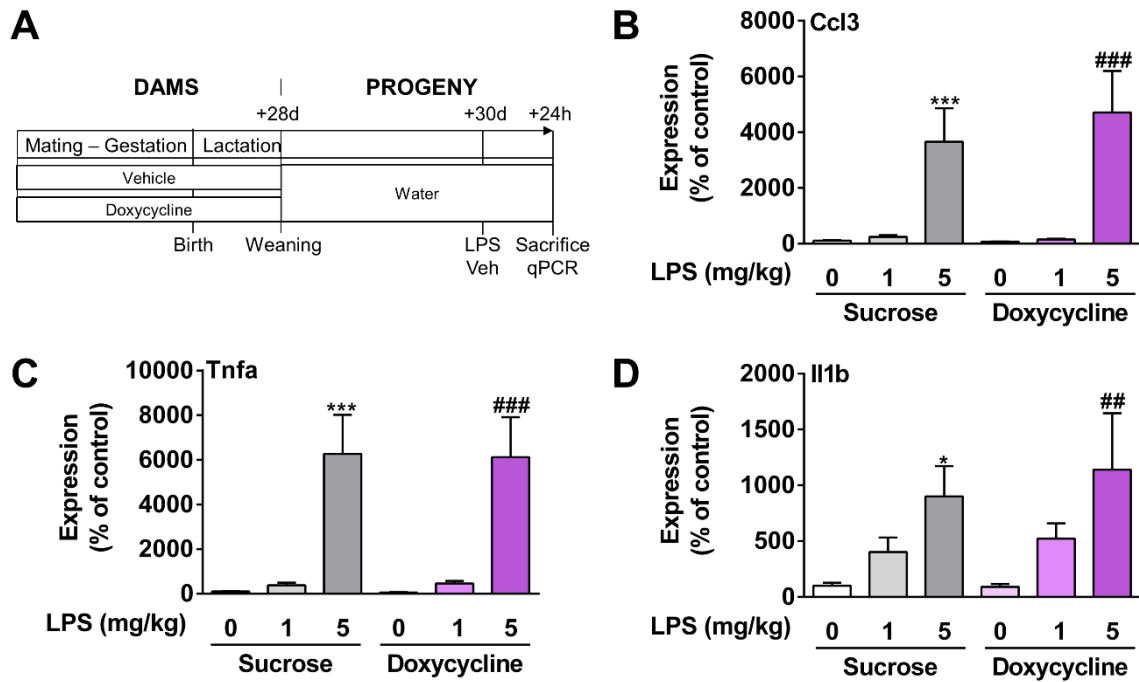


Figure 34 : Effet de la doxycycline périnatale sur la neuroinflammation hippocampique induite par le LPS chez la souris adulte. (A) Des femelles gestantes C57Bl6/J ont été traitées à la doxycycline 0,2 mg/mL dans leur boisson à 2,5% de sucrose, de l'accouplement jusqu'au sevrage des petits (P28). Un mois après leur sevrage, les souris ont été injectées avec une solution saline ou de LPS (1 ou 5 mg/kg). L'expression de plusieurs gènes inflammatoires a été évaluée par qPCR dans les différents groupes d'animaux 24 heures après l'injection : Il1b (B), Tnfa (C) et Ccl3 (D). L'injection de LPS à 5 mg/kg augmente significativement ces trois marqueurs par rapport à l'injection saline, sans différence entre les souris traitées ou non périnalement avec de la doxycycline, supportant que la doxycycline ne modifie pas le développement neuroinflammatoire de ces souris à l'âge adulte. *p<0,05, ***p<0,05 vs groupe sucrose/solution saline (LPS 0 mg/kg), ##p<0,01, ###p<0,001 vs groupe doxycycline/solution saline (LPS 0 mg/kg) en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 4 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

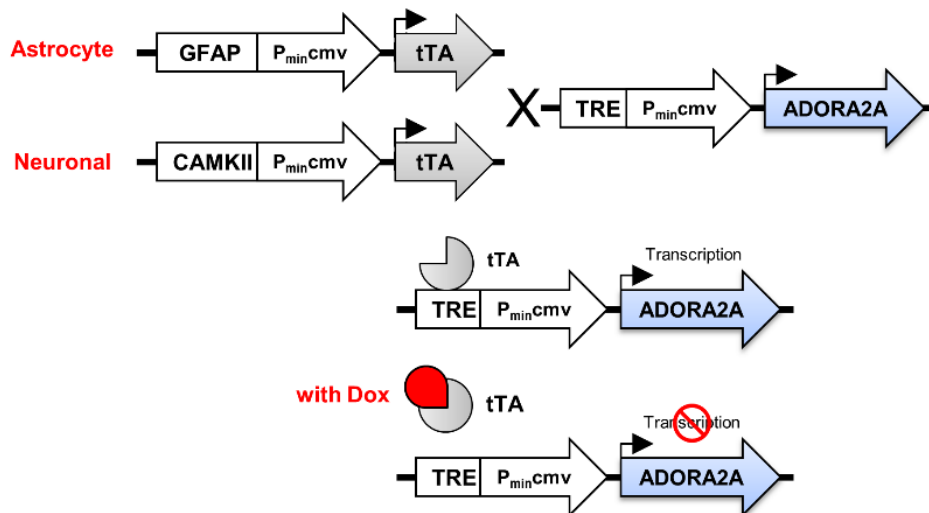


Figure 35 : Nouveau modèle de surexpression conditionnelle des A_{2A}Rs. Un cDNA codant pour le A_{2A}R de souris a été placé sous la dépendance d'un promoteur *Tet-responsive Element* (TRE-A_{2A}R), ce dernier étant uniquement activé en présence de la protéine transactivatrice de la tétracycline (tTA). Ce système d'expression est inhibé par la doxycycline, qui est donnée aux mères avant l'accouplement et jusqu'au sevrage des petits de façon à bloquer la surexpression du A_{2A}R durant le développement. Les souris TRE-A_{2A}R ont été croisées avec des souris GFAP-tTA ou CaMKII-tTA afin d'induire la surexpression du A_{2A}R dans les neurones (CaMKII⁺) ou les astrocytes (GFAP⁺).

2.1.3. Modèle murin de pathologie tau (THY-Tau22)

Ce modèle a également été développé au sein du laboratoire et est caractérisé depuis plusieurs années. L'expression d'une protéine tau humaine mutée en deux sites (G272V et P301S), sous la dépendance d'un promoteur neuronal (THY1.2), permet le développement progressif d'une pathologie tau, apparaissant à 3 mois jusqu'à atteindre un plateau vers 12 mois (Figure 36). La progression de la pathologie tau dans ce modèle est corrélée à un déclin cognitif progressif (Schindowski *et al.*, 2006; Van der Jeugd *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2016).

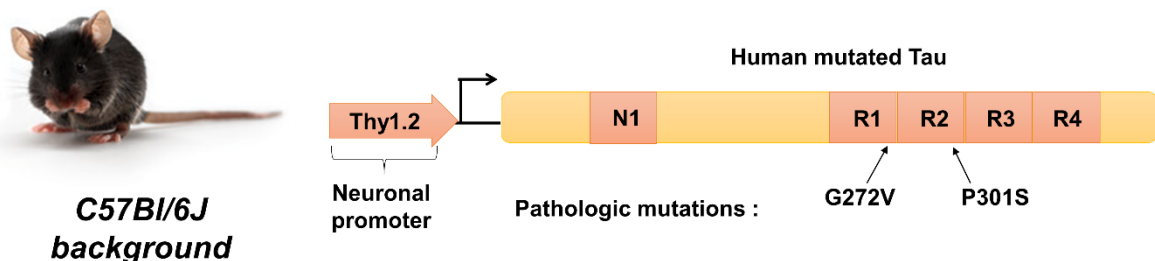


Figure 36 Le modèle murin THY-Tau22. La souris THY-Tau22 exprime une protéine tau humaine 4R mutée en deux sites (G272V et P301S), exprimée sous contrôle du promoteur neuronal THY1.2. Les souris THY-Tau22 développent une pathologie tau progressive, maximale à 12 mois, qui est également corrélée à un déclin cognitif progressif.

2.1.4. Modèle murin de pathologie amyloïde (APP^{sw}/PS1^{dE9})

La lignée APP^{sw}/PS1^{dE9} (APP/PS1) exprime sous le contrôle du promoteur de la protéine prion murine (PrP) deux protéines : (i) le précurseur du peptide amyloïde (APP) humain muté en deux sites : K594M/N595L (mutation associée à une famille suédoise ; *swedish mutation*) et (ii) la préséniline 1 humaine dont l'exon 9 a été supprimé (Figure 37). La voie amyloïdogénique est fortement augmentée dans ce modèle due à la surexpression de l'APP dont la double mutation favorise le clivage par la β -sécrétase. De plus, la délétion de l'exon 9 altère la fonction de l'activité γ -sécrétase, favorisant ainsi la formation de peptides amyloïde A β plus grands et plus toxiques, avec augmentation du ratio A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ (Jankowsky *et al.*, 2001, 2004).

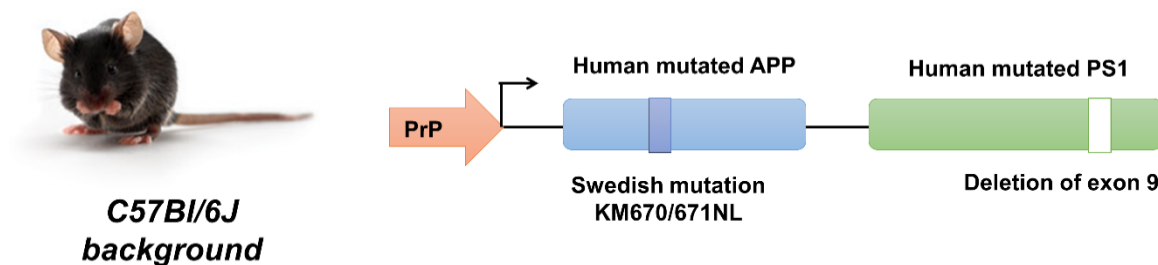


Figure 37 : Le modèle murin APP^{sw}/PS1^{dE9}. La souris APP^{sw}/PS1^{dE9} exprime une protéine APP humaine avec une mutation *swedish* (K594M/N595L) ainsi qu'une protéine préséniline 1 (PS1) dont l'exon 9 a été retiré, toutes deux sous contrôle du promoteur neuronal PrP.

2.1.5. Stratégie de croisements

Les souris triples transgéniques (THY-Tau22 surexprimant les A_{2A}Rs dans les astrocytes ou les neurones) et leurs contrôles de portées ont été obtenues par deux croisements successifs, afin d'obtenir en premier lieu des souris mâles doubles transgéniques THY-Tau22/TRE-A_{2A}R, puis en second lieu de les croiser avec des souris femelles GFAP-tTA ou CaMKII-tTA afin d'obtenir les animaux triples transgéniques (Figure 38). La surexpression des A_{2A}Rs est induite après le sevrage des souriceaux, au 28^{ème} jour après la naissance, par le retrait de la doxycycline de l'eau de boisson. Huit génotypes sont obtenus : WT, CaMKII-tTA, TRE-A_{2A}R, CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R, THY-Tau22, THY-Tau22/CaMKII-tTA, THY-Tau22/TRE-A_{2A}R and THY-Tau22/CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R et six d'entre eux sont utilisés dans les expériences (Figure 38). Les souris sauvages et THY-Tau22 ne possédant aucun des transgènes du système Tet-off ont été utilisées afin de vérifier l'absence de différence entre mâles et femelles concernant les marqueurs classiquement dérégulés dans les THY-Tau22 (Figure 38). Il a été fait de même pour les animaux issus de la lignée GFAP-tTA. Les animaux qui présentent un des deux transgènes du système Tet-off sous fonds sauvage ont été

regroupés sous le terme « WT » et ceux sous fond THY-Tau22 sous le terme « Tau », après avoir vérifié que les génotypes ainsi regroupés ne présentaient pas de différence en termes de comportement ou de phosphorylation de tau.

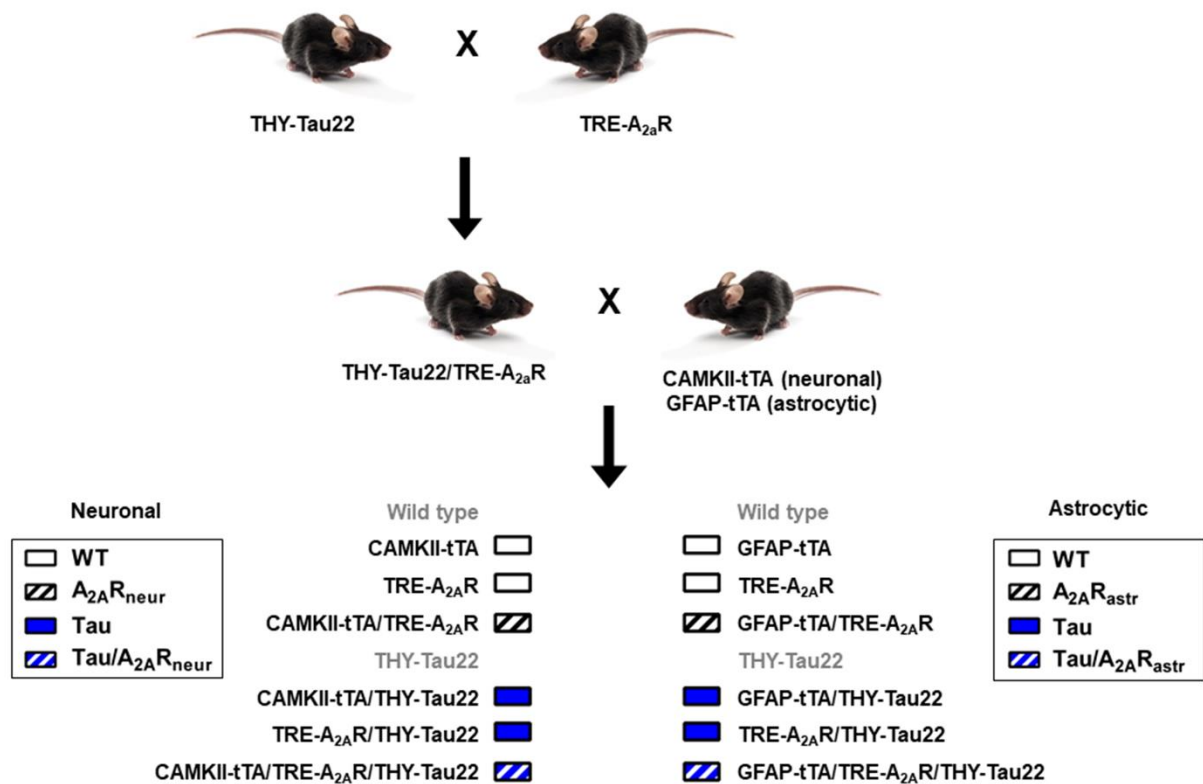


Figure 38 : Plan de croisements des souris Tau/A_{2A}R_{Astr} et Tau/A_{2A}R_{Neur}. Les souris triples transgéniques (THY-Tau22 surexprimant les A_{2A}Rs dans les astrocytes ou les neurones) et leurs contrôles de portées ont été obtenus par croisement de souris doubles transgéniques mâles THY-Tau22/TRE-A_{2A}R avec des souris femelles GFAP-tTA ou CaMKII-tTA. Ces souris transgéniques sont maintenues au laboratoire. L'expression du A_{2A}R est induite après sevrage par le retrait de la doxycycline. Parmi les huit génotypes générés, six ont été utilisés dans les expériences ; les souris sauvages et THY-Tau22 ne possédant aucun des transgènes du système Tet-off ont été écartés. Enfin, les animaux présentant un des deux transgènes du système Tet-off sous fond sauvage ont été regroupés dans le groupe « WT » et ceux sous fond THY-Tau22 dans le groupe « Tau ». Les souris surexprimant le A_{2A}R neuronal et astrocytaire ont été regroupées sous les termes « A_{2A}R_{Neur} » et « A_{2A}R_{Astr} ».

2.1.1. Injections stéréotaxiques

Dans le cadre du projet de surexpression neuronale du A_{2A}R chez les souris APP^{sw}/PS1dE9, nous avons eu recours à des injections stéréotaxiques afin d'injecter un virus associé aux adénovirus (AAV) permettant l'expression de la protéine transactivatrice de la tétracycline (tTA) dans des souris APP^{sw}/PS1dE9/TRE-A_{2A}R. Le plasmide AAV2/5-CBA-tTA-WPRE-bGH a été fourni par Nicole Déglon. Cet AAV a été dilué dans du PBS avec 0,001% d'acide pluronique et utilisé à la concentration finale de 5.10⁷vg/μl.

Les animaux ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (100mg/kg) et xylazine (20mg/kg). Une fois endormie et après avoir vérifié l'absence de réflexe, les animaux ont été rasés sur le crâne à l'aide d'une lame de scalpel et d'éthanol 70° en prenant grand soin de ne pas toucher les yeux. La peau a ensuite été désinfectée à la bétadine. L'animal a ensuite été placé à plat sur le cadre stéréotaxique, en plaçant ses dents dans la barre de geule et en serrant des barres d'oreilles de façon symétrique. Une incision longitudinale a été réalisée avec un scalpel stérile afin de dévoiler le crâne. Les coordonnées du bregma et du lambda, suivant les lignes de fusion du crâne, ont été mesurées par stéréotaxie afin de déterminer l'endroit précis d'injection (Figure 39). Les trois coordonnées spatiales ont été déterminées par rapport au bregma de la manière suivante : antéro-postérieur : bregma -2,5 cm ; médio-latéral : bregma -1 cm (à droite) et +1 cm (à gauche) ; dorso-ventral : bregma -1,8 cm. Un repère a été placé sur le crâne afin de déterminer les deux positions d'injections puis le crâne a été percé avec une fraise à vitesse moyenne. La poussière d'os a ensuite été retirée par un coton tige. La seringue Hamilton 1707 RN de 10µl a préalablement été rincée à l'éthanol 70° puis à l'eau 10 fois. La seringue a ensuite été chargée avec les AAV et lentement descendue le long des coordonnées stéréotaxiques. Le programme d'injection suivant a été utilisé : une minute d'attente suivi d'une injection de 2 µL à 0,25 µL/min pendant cinq minutes. Après avoir réalisé l'injection de façon bilatérale, la peau a été humidifiée au sérum physiologique et recousue. De la bétadine en gel a été placée le long de la cicatrice et les souris sont mise à l'écart dans une cage sous surveillance. Les animaux sont ensuite régulièrement surveillés jusqu'aux tests comportementaux qui ont suivis, trois mois plus tard.

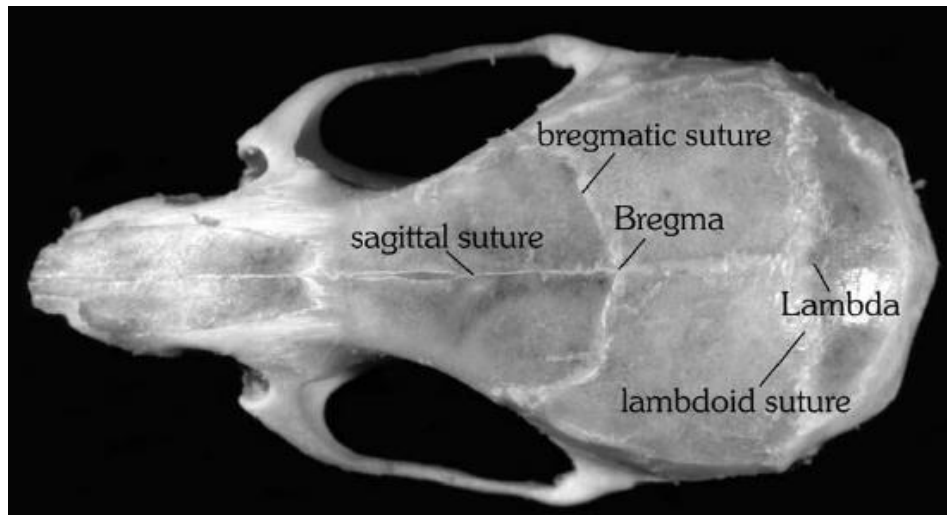


Figure 39 : Structure du crâne de souris. Le bregma est utilisé comme repère pour les injections stéréotaxiques.

2.2. Analyses comportementales

Les animaux ont d'abord été évalués dans différents tests comportementaux à l'âge de 5 à 6 mois. Ces tests ont été réalisés sur la plateforme d'exploration comportementale de la SFR DN2M au pôle recherche de la faculté de Médecine à Lille.

2.2.1. Le test d'actimétrie

Le test d'actimétrie permet d'évaluer l'activité motrice spontanée des souris dans un champs ouvert, via des rayons photoélectriques infrarouges (Figure 40A). Les souris ont été placées dans des cage d'actimétries (Bioseb, LE8816) (45 cm x 45 cm x 35 cm) et éclairées à 40 Lux. Dans chaque cage se trouve deux faisceaux infrarouges : le premier à 1 cm du sol permettant d'évaluer les mouvements horizontaux de l'animal et un deuxième à 7 cm du sol permettant d'évaluer les mouvements verticaux (comme les redressements). Durant le test, l'animal a été libre d'explorer la cage pendant 10 minutes. La vitesse de l'animal, la distance parcourue et le nombre de redressements ont été enregistrés par le logiciel Actitrack (Bioseb).

2.2.2. Le test du labyrinthe en croix surélevé

Le but de ce test est d'explorer le comportement de type anxiété en se basant sur l'aversion des souris pour les environnements ouverts (Figure 40B). Ce test consiste en un labyrinthe en forme de croix surélevé avec deux bras fermés et deux bras ouverts (30 cm de long x 6,5 cm de largeur). Les souris ont été placées au centre du labyrinthe avec leur tête en regard d'un des

bras fermés et ont exploré librement le labyrinthe pendant 5 minutes. Le temps passé dans chaque bras est enregistré par le logiciel Ethovision XT tracking system (Noldus).

2.2.1. Le test du labyrinthe en Y

La mémoire spatiale à court terme a été évaluée en utilisant le test du labyrinthe en Y (Figure 40C). Chaque bras du labyrinthe en Y mesure 22 cm de long, 6,4 cm de large et 15 cm de hauteur. Les murs sont complètement opaques. Des indices spatiaux ont été placés sur les murs tout autour du labyrinthe afin de permettre le repérage spatial des animaux. De la litière a été placée au fond du labyrinthe et mélangée après chaque passage. La localisation des bras de départ, nouveau bras et autre bras a été randomisé pour chaque animal. Durant la phase d'exposition, les souris ont été placées au bout du « bras de départ » et ont été laissées libre d'explorer le « bras de départ » et « l'autre bras » pendant 5 minutes (à partir du moment où la souris quitte le bras de départ). L'accès au « nouveau bras » a été bloqué par une porte opaque. La souris a ensuite été retirée du labyrinthe puis replacée dans le « bras de départ » après 5 minutes. Dans la phase de test, la souris a été de nouveau placée dans le « bras de départ » et a été laissée libre d'explorer l'ensemble du labyrinthe pendant 1 minute (à partir du moment duquel la souris à quitter le « bras de départ »). Le temps passé dans chaque bras durant les deux phases a été enregistré par le logiciel Ethovision XT tracking system (Noldus). Lors de la phase de test, un index de discrimination a été calculé de la façon suivante : $[\text{nouveau bras} / (\text{nouveau bras} + \text{autre bras})] \times 100$.

2.2.2. Le labyrinthe de Barnes

Le labyrinthe de Barnes permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale des animaux (Figure 40D). Dans ce test, les souris doivent apprendre à retrouver une boîte d'échappement située sous un des 40 trous. Pour se faire, les souris ont besoin de se repérer via des indices spatiaux situés tout autour du labyrinthe sur les murs. Le labyrinthe est une table circulaire en PVC blanc de 120 cm de diamètre et munie de 40 trous, chacun mesurant 5 cm de diamètre et étant situés à 5 cm du bord. La table circulaire est située à 80 cm du sol et est posé sur un tabouret rotatif, de façon à tourner le labyrinthe à chaque passage. Le labyrinthe est éclairé à 80 Lux et filmé par une caméra au dessus, relié au logiciel de suivi de l'animal, EthoVision (Noldus).

Le premier jour les animaux explorent le labyrinthe pendant deux minutes et sont placés dans la boîte d'échappement sous le trou cible s'ils ne parviennent pas à le trouver, ceci afin de familiariser l'animal avec le test. Le trou cible est défini aléatoirement pour chaque souris.

Lors de l'apprentissage, les souris vont durant quatre jours et pendant quatre sessions par jour, apprendre à localiser le trou cible afin de retourner dans la boîte d'échappement. Avant chaque essai, les animaux sont placés dans un cylindre pendant 10 secondes, puis ce dernier est retiré, démarrant ainsi la session d'enregistrement. Pour chaque session, la souris doit retrouver la cible en moins de trois minutes. Si elle ne le trouve pas, elle est guidée par l'expérimentateur jusqu'à ce dernier et laissée pendant 30 secondes. Les souris passent par série de trois, avec 15 minutes de repos entre chaque session. Le labyrinthe est nettoyé à l'éthanol 70°C après chaque essai et tourné de 45° chaque jour, ceci afin d'éviter un indicage olfactif. Lors de chaque essai, la distance parcourue jusqu'au trou cible est mesurée. Un jour après le dernier essai, les animaux ont été soumis à un test de rétention au cours duquel la boîte d'échappement a été retirée. Lors de cette phase, les souris ont été laissées libres d'explorer le labyrinthe pendant 90 secondes. Le labyrinthe est virtuellement divisé en quatre quadrants : le quadrant cible comprenant le trou cible en son centre, le quadrant opposé au précédent, et les deux quadrants adjacents. Si l'animal a établi une relation entre les indices spatiaux présents dans la pièce au cours de l'apprentissage et la position du trou cible, il passera plus de temps dans le quadrant cible versus les autres. Le temps que l'animal met à retrouver pour la première fois le trou cible (latence) a également été mesuré.

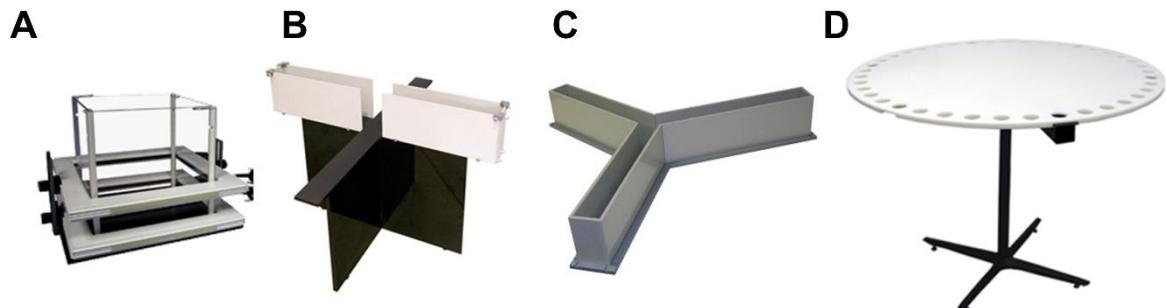


Figure 40 Tests comportementaux utilisés. (A) Test d'actimétrie (activité spontanée et motricité). (B) Test du labyrinthe en croix surélevé (comportement de type anxieux). (C) Labyrinthe en Y (mémoire spatiale). (D) Labyrinthe de Barnes (apprentissage et mémoire spatiale).

2.3. Euthanasie des souris

Les animaux ont été euthanasiés à l'âge de 6 mois. Les mâles l'ont été par dislocation cervicale, puis leurs cerveaux ont été récupérés, les hippocampes gauche et droit ont été disséqués en utilisant une matrice de découpe coronale en acrylique (Delta Microscopies) à 4°C et stockés à -80°C pour analyses biochimiques et transcriptomiques ultérieures. Les

féelles, utilisées pour les études d'immunohistochimie, ont été anesthésiées profondément avec du pentobarbital sodique (50mg/kg.i.p), ensuite perfusées dans le ventricule gauche du cœur avec une solution froide de NaCl (0,9%, 4°C) puis avec 4% de paraformaldéhyde dans du PBS (pH 7,4). Les cerveaux ont ensuite été retirés, post-fixés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24 h puis cryo-protégés dans du PBS contenant 30 % de sucrose avant d'être congelés à -35°C dans de l'isopentane (methyl-butane) et stockés à -80°C. Les coupes coronales de cerveaux (35 µm) ont été obtenues en utilisant un cryostat Leica, possédant une chambre à -20°C. Du tissu-tek OCT a été utilisé pour enrober le tissu et le fixer au support de coupe. Les coupes flottantes ont été choisies en accord avec les règles stéréologiques, avec la première section prise de manière aléatoire puis toutes les 12 sections consécutives, dans le plan rostro-caudal, et ont été stockées dans du PBS azide (0,2%) à 4°C jusqu'à utilisation, afin de les protéger d'une contamination microbienne.

2.4. Analyses biochimiques

2.4.1. Préparation des homogénats, dosage protéique et immuno-empreinte

Les tissus préalablement disséqués ont été homogénéisés par sonication dans 200 µL d'une solution Tris-Sucrose (Tris-HCl 10mM, Sucrose 0,32M, pH 7,4, inhibiteurs de protéases : 1 pastille de Complete mini EDTA-free Roche® dans un volume de 10 mL). Les tissus ont ensuite été homogénéisés à 4°C pendant une heure. Les homogénats ont été gardés à -80°C jusqu'à utilisation. La concentration protéique a été déterminée en utilisant un dosage basé sur l'acide bicinchonique (BCA ; Pierce) puis les échantillons ont été dilués dans un tampon de lithium dodécyl sulfate (LDS) 4X (pour dénaturer les protéines et les charger négativement) et d'agents réducteurs 10X (dithiothréitol pour casser les ponts disulfures) (NuPage®) puis chauffés à 100°C pendant 10 min. La migration est réalisée à 200V pendant une heure dans un tampon de migration (MOPS SDS Running Buffer (20X), NuPage®). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Hybond, GE Amersham®). Une coloration réversible au rouge ponceau (Ponceau 2R 0,2 %, Acide Trichloroacétique 3 %) a été effectuée pour s'assurer de la bonne efficacité du transfert. Les membranes ont ensuite été saturées avec du lait de vache reconstitué à 5% ou de l'albumine de sérum bovin à 5% dans du TNT (Tris 15 mM pH8, NaCl 140 mM, Tween 0,05 %) et incubé à 4°C pendant 24 heures avec les anticorps primaires (Tableau 4). Les anticorps anti-tau utilisés, ainsi que leurs sites de fixations, sont montrés sur la Figure 41.

Après rinçage, les membranes ont été incubées en présence d'un anticorps secondaire (IgG (H+L) couplé à une activité peroxydase HRP (horseradish peroxidase) en fonction de

l'anticorps primaire : anti-souris, anti-lapin (PI-2000 et PI-1000 respectivement, Vector Laboratories) ou anti-cochon d'inde (A7289, Sigma-Aldrich) pendant 45 minutes à température ambiante et le signal a ensuite été visualisé via un kit de chimioluminescence (ECL, Amersham Bioscience) et un système d'imagerie LAS4000 (Fujifilm). Les résultats ont été normalisés sur l'actine ou la GAPDH et la quantification a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ.

2.4.2. Electrophorèse bidimensionnelle

Cette expérience a été réalisée à partir d'un homogénat de 75 µg de protéines issues de sept animaux de chaque groupe (Tau22 et Tau22/A_{2A}R_{Neur}) dans un volume de 20µL. Les protéines ont été reprises à volume égal dans un tampon SDS 2X (Tris 20mM, SDS 2%, QSP 100mL) et bouillies cinq minutes à 100°C. Afin de précipiter les protéines, 10 volumes d'acétone ont été ajoutés à la solution (400 µl ici) puis le mélange a été laissé à -20°C pendant 10 minutes. Une centrifugation (12000 g, 4°C, 10 minutes) a ensuite été réalisée et le surnageant a été retiré. Les échantillons ont été mis à sécher sous une hotte afin d'éliminer les résidus d'acétone. 200 µl de tampon UTC 4% (urée 8M, thio-urée 2M, chaps 4%) ont été ajoutés aux échantillons puis ceux-ci ont été soniqués. Un mélange de pharmalytes (1,1 µl d'IPG 3-11) a été ajouté, avec 2,2 µl de Bleu de bromophénol et 1,1 µl de Destreak. Le Destreak prévient l'oxydation des groupements thiols et réduit l'apparition de stries lors de la migration. L'isoélectrofocalisation a ensuite été réalisée sur des bandelettes (*strips*) de gels contenant des immobilines créant un gradient de pH. Ces bandelettes mesurent 11 cm et couvrent un gradient de pH compris entre 3 et 11 (pH 3-11 NL, 11 cm, Amersham GE, Velizy-Villacoublay, France). Celles-ci sont réhydratées de manière passive pendant une nuit à température ambiante afin de s'imprégner des protéines de l'échantillon. L'isofocalisation a été réalisé le lendemain par le programme IPG Ettan IGPphor "3-11 Tau NL 11cm" à 20°C, celle-ci dure environ cinq heures. Les strips ont été équilibrées dans un tampon d'équilibration (Tris-HCl 25mM pH 6,8, DTT 20mM, glycérol 10%, SDS 5% et bleu de bromophénol 0,05%) puis déposées sur un gel d'immuno-empreinte Criterion (Bio-Rad) afin de réaliser la seconde dimension. Après séparation sur gel dénaturant, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose et l'immuno-marquage avec l'anticorps anti-tau total (Cter) a été réalisé comme indiqué dans le paragraphe précédent.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Name	Epitope	Tissue	Type	Origin	Provider	IHC
Anti-A _{2A} adenosine receptor	C-terminus 33 aa	M	poly	guinea-pig	Frontiers institute #Af1000	1/2 500
Anti-hA _{2A} adenosine receptor	C-terminus (PPGLDDPLADGAG)	H	poly	rabbit	Yijuang Chern	1/500
Anti-Conformational-Tau (MC1)	N-ter amino acids 7-9 and 313-322	M	mono	mouse	Peter Davies	1/1 000
Anti-C1qa	Full length native mouse C1q (purified)	M	mono	rabbit	Abcam #ab182451	1/10 000
Anti-Choline Acetyltransferase	Human placental enzyme.	M	poly	rabbit	Merck #AB143	1/2 000
Anti-DCX	C-ter region of human DCX	M	poly	goat	Santacruz #sc8066	1/500
Anti-GFAP	GFAP isolated from cow spinal cord	M	poly	rabbit	Dako #Z0334	1/500
Anti-Iba1	Human Iba1 aa 135-147 (C terminal)	M	poly	goat	Abcam #ab5076	1/500
Anti-NeuN	Purified cell nuclei from mouse brain	M	mono	mouse	Millipore #MAB377	1/500
Anti-S100 β	bovine brain S-100b	M	mono	mouse	Sigma-Aldrich #S2532	1/1 000
Anti-GAD67 (1G10.2)	Recombinant GAD67 protein	M	mono	mouse	Millipore #MAB5406	1/400
Anti-Phospho-Tau (AT8)	pS202/T205	H	mono	mouse	ThermoFisher #MN1020	1/500
Anti-total Tau (TauE1E2)	Nter first 34-53st aa of NH2 terminus	M	mono	mouse	Home-made	1/500
Anti-VGAT	hydrophilic N-terminal domain of the protein	M	poly	rabbit	Bruno Gasnier	1/500
Anti-VGLUT1	AA 456 to 560 from rat VGLUT	M	poly	guinea-pig	Synaptic Systems #135 304	1/500

BIOCHEMISTRY

Name	Epitope	Tissue	Type	Origin	Provider	WB
Anti-A _{2A} adenosine receptor	C-terminus 33 aa	M	poly	guinea-pig	Frontiers institute #Af1000	1/5 000
Anti-hA _{2A} adenosine receptor	3 rd intracellular domain	H	mono	mouse	Covalab #mAb70192	1/1 000
Anti-Phospho-Tau (Tyr18)	pY18	M	mono	mouse	Medimabs #MM-0194-P	1/1 000
Anti-Phospho-Tau (AT270)	pT181	M	mono	mouse	Invitrogen #MN1050	1/1 000
Anti-Tau 1, clone PC1C6	Non-phospho-S195, 198, 199, 202	M	mono	mouse	Millipore #MAB3420	1/10 000
Anti-Phospho-Tau (Ser199)	pS199	M	poly	rabbit	Home-made	1/2 000
Anti-Phospho-Tau (AT100)	pT212/S214	M	mono	mouse	Invitrogen #MN1060	1/1 000
Anti-Phospho-Tau (Ser262)	pS262	M	poly	rabbit	Invitrogen #44-750G	1/1 000
Anti-Phospho-Tau (Ser396)	pS396	H/M	poly	rabbit	Invitrogen #44-752G	1/10 000
Anti-Phospho-Tau (Ser404)	pS404	M	poly	rabbit	Invitrogen #44-758G	1/10 000
Anti-Phospho-Tau (Ser422)	pS422	M	poly	rabbit	Invitrogen #44-764G	1/2 000
Anti-total Tau (C-ter)	Cter last 15 aa of COOH terminus	M	poly	rabbit	Home-made	1/10 000
Anti-total Tau (M19G)	Nter first 19 aa of NH2 terminus	M	poly	rabbit	Home-made	1/10 000
Anti-Choline Acetyltransferase	Human placental enzyme.	M	poly	rabbit	Merck #AB143	1/2 000
Anti-p38 MAPK	Human p38 MAPK	M	poly	rabbit	Cell signaling #9212	1/1000
Anti-Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Human pT180/Y182 p38 MAPK	M	poly	rabbit	Cell signaling #9211	1/1000
Anti-Caseine Kinase 2 β	Human CKII-beta	M	poly	rabbit	Sigma-Aldrich #SAB4500516	1/1000
Anti-Glycogen synthase kinase-3 β	Xenopus laevis GSK3 β	M	mono	mouse	Santacruz #sc7291	1:500
Anti-Phospho-GSK3 β (Tyr216)	Human pY279/216 GSK3 β	M	poly	rabbit	Santacruz #135653	1:500
Anti-JNK/SAPK	Human JNK2 fusion protein	M	poly	rabbit	Cell Signaling #9252	1/1000
Anti-Phospho-JNK/SAPK	pT183/Y185 of human JNK	M	poly	rabbit	Cell Signaling #9251	1/1000
Anti-p35	C-terminus of human p35	M	poly	rabbit	Santacruz #sc820	1:500
Anti-CDK5 (J-3)	Human CDK5	M	mono	mouse	Santacruz #sc6247	1:500
Anti-p44/42 MAPK	p44/42 MAPK	M	mono	mouse	Cell signaling #9107	1/1000
Anti-Phospho-p44/42 MAPK	Human pThr202/Tyr204 p44 MAPK	M	poly	rabbit	Cell signaling #9106	1/1000
Anti- β -Actin (AC-15)	N-terminus	H	mono	mouse	Sigma-Aldrich #A5441	1/ 20 000
Anti-GAPDH	Mouse GAPDH FL1-335	H/M	poly	rabbit	Sigma-Aldrich #G9545	1/50 000

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés.

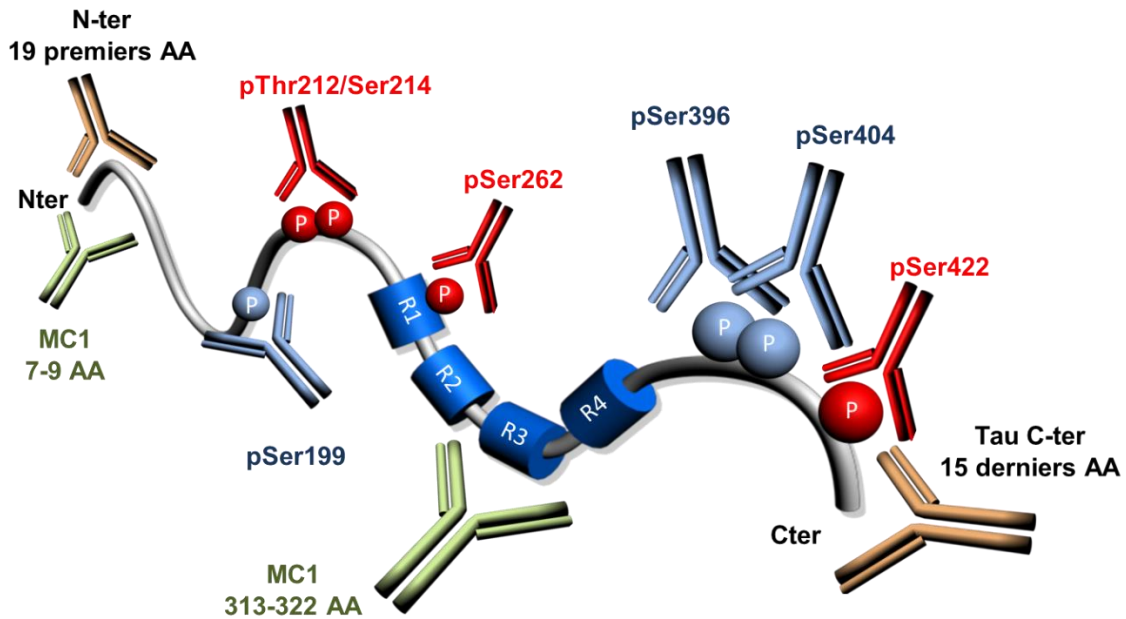


Figure 41 : Principaux anticorps anti-tau utilisés. Les anticorps pSer199, pSer396 et pSer404 reconnaissent des épitopes de phosphorylations physiologiques dans le cerveau humain et hyperphosphorylés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les anticorps en pThr212/Ser214, pSer262 et pSer422 reconnaissent les épitopes uniquement phosphorylés chez les patients. L'anticorps MC1 reconnaît deux épitopes, marquant une conformation particulière et anormale de tau. Les deux anticorps orange, N-ter et C-ter, sont phospho-indépendants et permettent de marquer la protéine tau totale.

2.4.3. ELISA

Les niveaux d'A β 1-40 et A β 1-42 ont été mesurés dans les homogénats de cerveaux par un kit ELISA (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, 20 μ g issus des homogénats de cortex et d'hippocampe ont été dilués dans un tampon guanidine/tris (Guanidine 5M HCl, Tris 50mM pH 8), soniqués et incubés 1 heure à 4°C sous agitation. Les échantillons ont ensuite été dilués dans une solution BSAT-DPBS (KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄, BSA 5%, Tween-20 0,03% pH 7,4). Les homogénats ont été centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants ont été collectés pour l'analyse d'A β 1-40 et A β 1-42 par une méthode immuno-enzymatique colorimétrique. L'absorbance a été mesurée par un Multiskan Ascent counter (ThermoLab Systems). Les quantités normalisées d'A β ont été exprimées en pg/mL.

2.5. Analyses protéomiques

2.5.1. Digestion protéique

Les protéines utilisées proviennent des homogénats en tampon Tris-sucrose de la partie précédente. 50 μ g de protéines ont été collectés et réduits avec un volume équivalent à 0,1M

de dithiothreitol pendant 15 minutes à 95°C. La préparation des échantillons par filtration (Wiśniewski *et al.*, 2009) a été réalisée en utilisant des filtres à centrifugation 30K Amicon (Millipore) et de la trypsine (40 µg/ml dans de l'ammonium bicarbonate 50mM, à 37°C, sur la nuit) pour digérer et réduire les protéines extraites. Les protéines digérées ont été collectées par centrifugation et les appareils de filtration ont été rincés au NaCl 0,5 M. La digestion a été arrêtée en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA) 5% dans les digestions. Les échantillons collectés ont été désalés en utilisant l'appareil C18 ZipTip (Millipore), séchés sous aspiration et reconstitués dans de l'acide formique/acétonitrile 0,1% (98:2, volume/volume) avant l'analyse par spectromètre de masse NanoLC-MS/MS.

2.5.2. Analyse par spectromètre de masse NanoLC-MS/MS

Les peptides ont été séparés par une chromatographie en phase inversée en utilisant un système EASY-nLC 1000 UPLC (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une pré colonne Acclaim PepMap 100 de 75µm x 2 cm avec des raccords nanoViper (C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) et une colonne analytique Acclaim PepMap RSLC de 75µm x 50cm (C18, 2 µm, 100 Å, Thermo Fischer Scientific). La séparation a été obtenue en utilisant des quantités croissantes d'acétonitrile (5-30% sur 120 minutes) à un flux de 300 nl/min. Les données ont été acquises sur un spectromètre de masse Thermo Scientific Q-Exactive afin d'acquérir le top 10 MS/MS sur le mode « data-dependent ». Les scans de surveillances ont un pouvoir résolutif de 70 000 FWHM (m/z 400), dans un mode positif et en utilisant une valeur cible AGC de $3 \cdot 10^6$. L'état de charge par défaut a été mis à 2, non assigné et un état de charge +1 a été rejeté et l'exclusion dynamique a été activée pendant 20 secondes. La portée du scan a été mise sur 300-1600 m/z, un microscan a été acquis à 17 500 FWHM avec une fenêtre d'isolation de 4 m/z et une énergie de collision normalisée HCD de 30 a été utilisée.

2.5.3. Identification des protéines et analyse

Toutes les données de spectrométrie de masse ont été analysées avec le logiciel MaxQuant (version 1.6.5.0) en utilisant le moteur de recherche Andromeda. Les protéines ont été identifiées en recherchant les données MS et MS/MS contre le protéome révisé de *Mus musculus* dans la base de données UniProt (sortie en mars 2019, 17005 entrées). La spécificité de la trypsine a été utilisée pour le mode de digestion. Les acétylations N-terminales et l'oxydation des méthionines ont été sélectionnées comme variable et la carbamidométhylation des cystéines a été utilisée comme modification fixe. Jusqu'à deux clivages manqués ont été autorisés. Une précision de la masse initiale de 6 ppm a été sélectionnée pour le spectre MS.

La tolérance MS/MS a été placée à 20 ppm. Le taux de fausse découverte dans le spectre de reconnaissance peptidique et des niveaux de protéines a été estimé en utilisant une version leurre de la précédente base de données définie (construction inversée) et réglée à 1%. La quantification relative sans marquage (*label free quantification*, LFQ) des protéines a été conduite avec le logiciel MaxQuant en utilisant l'algorithme MaxLFD avec les paramètres par défaut. Le fichier contenant les informations à propos de l'identification des protéines a été utilisé dans le logiciel Perseus pour l'analyse (<http://www.perseus-framework.org>) (version 1.6.5.0). Les fausses reconnaissances issues de la base de données inversées, les protéines avec uniquement des peptides modifiés et les contaminants potentiels ont été retirés. Les intensités des LFQ ont été transformées par le logarithme Base 2. Une analyse multivariable sans supervision a été réalisée pour l'analyse en composante principale (PCA). Afin d'analyser les différences entre les différents groupes, une analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de Student avec une valeur $p < 0,05$, considérée comme statistiquement significative. Le regroupement hiérarchique a été réalisé seulement sur les protéines présentant des différences statistiquement significatives en valeur p , et avec une variation \log_2 (\log_2 fold change) $>$ ou $<$ à 0,32, en utilisant un paramètre euclidien pour le calcul de la distance, les options moyennes pour le lien en ligne et en colonne, et avec un maximum de 300 regroupements. Les réseaux d'association fonctionnel des protéines ont été obtenus en utilisant STRING (version 11,0, <http://string-db.org>).

2.6. Analyses transcriptionnelles

Les analyses transcriptionnelles par PCR quantitative (qPCR) ont été réalisées à partir des ADN complémentaires (ADNc) issus de l'hippocampe des souris.

2.6.1. Extraction des ARNs

L'extraction des ARNs totaux de l'hippocampe a été réalisée grâce au kit d'extraction pour tissus lipidiques (RNeasy lipid tissue, Qiagen) basé sur la technique de séparation phénol-chloroforme-isothiocyanate de guanidine. Les tissus disséqués conservés à -80°C ont été homogénéisés dans 1 mL de Quiazol Lysis Reagent via un polytron puis 200 μL de chloroforme ont été ajoutés à l'homogénat. Une centrifugation de 12000 g, pendant 15 minutes à 4°C a ensuite été réalisée. Deux phases ont été obtenues : une phase organique (phénol / chloroforme et protéines) et une phase aqueuse, cette dernière contenant les ARNs totaux. Les ARNs ont ainsi été prélevés puis précipités par ajout de 600 μL d'éthanol à 70%. Les ARNs ont ensuite été fixés sur colonne par liaisons hydrogènes, lavés et enfin élués par

40 μL d'eau sans RNases. Le dosage des ARN a été fait sur un Nanodrop ND1000 à une longueur d'onde de 260nm. Afin d'évaluer la pureté des ARNs, les ratio A260/A280 (contamination par des protéines) et A260/A230 (contamination par des composés organiques), doivent être situés entre 1,8-2. Les échantillons ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.6.2. Rétrotranscription et PCR quantitative (qPCR)

La rétrotranscription (RT) des ARNm en ADN complémentaires (ADNc) a été réalisée grâce à un kit (High Capacity cDNA reverse transcription, Applied Biosystem) et a nécessité 1 μg d'ARN. Les échantillons ont été rétrotranscrits dans un thermocycleur de type T gradient Biometra suivant le programme: 25°C pendant 10 secondes, 37°C pendant 2 heures, 85°C pendant 5 secondes. Les ADNc ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Pour la PCR quantitative (qPCR), les ADNc ont été dilués au 1/20ème (pour une RT à $1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$). La qPCR a été réalisée sur un StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilisant du SYBRgreen, un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce quand il est dans de l'ADN double brin, ou du TaqMan, une sonde qui s'hybride de manière spécifique sur la zone d'intérêt puis est hydrolysée par l'activité 5'-endonucléotidase de la polymérase afin de libérer le fluorophore de son quencher, permettant l'émission de fluorescence.

Pour le SYBR green, 2 μL de cDNA dilués ont été placés dans chaque puits avec 8 μL de master mix contenant 5 μL de SYBR green, 2,8 μL d'eau, 0,1 μL de primer sens et 0,1 μL de primer anti-sens (utilisé à 0,1 nM et avec une température de fusion d'environ 60°C). Le programme qPCR utilisé a été le suivant : 2 minutes à 50°C , suivi de 10 minutes à 95°C , puis 40 cycles (chacun de 15 secondes à 95°C puis de 25 secondes à 60°C), puis 15 secondes à 95°C . A la fin, et après 1 minute à 60°C , une incrémentation de 1°C jusqu'à 95°C a été réalisée afin d'obtenir une courbe de fusion pour vérifier la présence d'un seul produit d'amplification.

Pour le TaqMan, dans chaque puits ont été placés 4 μl des cDNA dilués avec 12 μL de master mix contenant 7,5 μL de TaqMan gene expression master mix (Life Technologies), 0,75 μL de sondes Taqman (contenant également les primers) et 3,75 μL d'eau. Le programme qPCR utilisé a été le suivant : 2 minutes à 50°C , 10 minutes à 95°C puis 40 cycles (chacun de 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C).

Pour les deux techniques, le gène de référence utilisé a été la peptidylprolyl isomerase A (PPIA ; appelé cyclophiline A chez les rongeurs) afin de normaliser les résultats (ΔCt). Le cycle seuil (*cycle threshold* – Ct) correspond au nombre de cycles permettant une détection

au-dessus du bruit de fond. Les amplifications ont été réalisées sur des duplicats et l'expression relative des gènes cibles a été déterminée par la méthode $\Delta\Delta C_t$.

<i>MOUSE</i>				
Primers	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length
Ccl3	NM_011337.2	TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG	112
Ccl4	NM_013652.2	GCCCTCTCTCTCTCTTGCT	GAGGGTCAGAGCCCATTG	72
Cd68	NM_009853.1	GACCTACATCAGAGCCCGAGT	CGCCATGAATGTCCACTG	95
Clec7a	NM_020008.2	ATGGTTCTGGGAGGATGGAT	GCTTTCCTGGGGAGCTGTAT	72
Gfap	NM_001131020.1	CGCGAACAGGAAGAGCGCCA	GTGGCGGGCCATCTCCTCCT	104
Iilb	NM_008361.3	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG	67
Itgax	NM_021334.2	ATGGAGCCTCAAGACAGGAC	GGATCTGGGATGCTGAAATC	62
Thr2	NM_011905.3	GGGGCTTCACTTCTCTGCTT	AGCATCCTCTGCGATTTGACG	110
Tnfa	NM_013693.2	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACTTCT	116
Cyclophilin A	NM_008907.1	AGCATACAGTCTTGGCATC	TTCACCTTCCCAAAGACCAC	126

<i>MOUSE</i>				
Taqman probes	Accession number	Assay ID	Assay Design	Amplicon length
C1qa	NM_007572.2	Mm00432142_ml	Probe spans exons	80
C1qb	NM_009777.2	Mm01179619_ml	Probe spans exons	75
C1qc	NM_007574.2	Mm00776126_ml	Probe spans exons	153
Csflr	NM_001037859.2	Mm01266652_ml	Probe spans exons	69
Trem2	NM_001272078.1	Mm04209424_g1	Probe spans exons	90
Cyclophilin A	NM_008907.1	Mm02342430_g1	Probe spans exons	148

<i>HUMAN</i>				
Taqman probes	Accession number	Assay ID	Assay Design	Amplicon length
<i>CIQA</i>	NM_015991.2	Hs00381122_ml	Probe spans exons	87
<i>CIQB</i>	NM_000491.3	Hs00608019_ml	Probe spans exons	78
<i>CIQC</i>	NM_001114101.1	Hs00757779_ml	Probe spans exons	99
<i>A_{2A}R</i>	NM_001278497.1	Hs00169123_ml	Probe spans exons	66
<i>ACTB</i>	NM_001300981.1	Hs99999904_ml	Amplicon spans exons	98

Tableau 5 : Liste des primers (qPCR SYBR Green) et sondes (qPCR Taqman) utilisés dans les études *in vivo*.

2.6.3. Séquençage de l'ARNm

Les bibliothèques de séquençage (N = 4 par groupe) ont été générées à partir de 300 ng d'ARNs totaux à partir du kit Illumina_Truseq RNA Sample Preparation Kit v2 (Part Number RS-122-2101). Brièvement, après avoir purifié les ARNm avec des billes magnétiques sur lesquelles sont attachées des oligonucléotides avec une séquence poly-T (permettant l'hybridation avec les queues poly-A des ARNm). Les ARNm ont ensuite été fragmentés en utilisant des cations divalents pendant deux minutes à 94°C. Les fragments d'ARNm clivés ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc simple brin en utilisant une transcriptase inverse et des

primers aléatoires. Un deuxième brin d'ADNc a été synthétisé en utilisant une ADN polymérase I et une RNase H. Après l'addition d'une seule base adénine (A) et une ligation consécutive d'un adaptateur sur les fragments d'ADNc double brins, les produits ont été purifiés et enrichis par PCR (30 secondes à 98°C, 12 cycles (10 secondes à 98°C, 30 secondes à 60°C puis 30 secondes à 72°C) puis enfin 5 minutes à 72°C afin de créer la librairie d'ADNc. L'excès de primers PCR a ensuite été retiré par purification en utilisant des billes AMPure XP (Beckman Coulter). La librairie d'ADNc a été vérifiée qualitativement et quantitativement en utilisant des capillaires d'électrophorèse. Le séquençage a été réalisé sur une machine Illumina Genome Hiseq4000 sur les extrémités terminales de 50 paires de base en suivant les instructions d'Illumina. Les séquences lues ont ensuite été replacées sur le génome complet de la souris (mm10) en utilisant le logiciel tophat-2.0.14 (Trapnell *et al.*, 2009) et la version bowtie-2-2.1.0 (Langmead *et al.*, 2009). Seules les séquences alignées avec une séquence cible unique ont été retenues pour les analyses suivantes. La quantification de l'expression génique a été réalisée en par le logiciel HTSeq-0.6.1 (Anders *et al.*, 2015) et les annotations de gène ont été réalisées par Ensembl release 90. Le nombre de lectures (*reads*) a été normalisé à travers les librairies avec la méthode proposée par Anders et Huber (Anders & Huber, 2010). L'analyse de l'expression différentielle a été conduite en utilisant la méthode proposée par Love *et al.*, (2014) implémenté dans DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.14.1). Les valeurs p ont été ajustées pour des comparaisons multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995). Les cartes de chaleurs (ou *heatmap*) ont été réalisées sur le logiciel en ligne <http://www.heatmapper.ca/expression/> avec les paramètres par défauts. Les volcano plots ont été réalisés sur le logiciel R en utilisant la macro suivante :

```
res <- read.table("Name_of_the_file.txt", header=TRUE)
head(res)
with(res, plot(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20, main="Volcano plot", xlim=c(-1,1)))
with(subset(res, padj<.05 & abs(log2FoldChange)>0.32), points(log2FoldChange, -log10(pvalue),
pch=20, col="red"))
```

L'analyse par ontology des gènes (Gene ontology ; GO) pour voir l'enrichissement fonctionnels a été réalisée en utilisant les outils DAVID (Huang *et al.*, 2009) et le logiciel d'analyse des réseaux protéiques STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017). Le génome complet murin (mm10) a été utilisé en fond. Les voies les plus enrichies sont présentées ($p < 0,05$ et $\text{Log2FoldChange} > \text{ou} < 0,32$ uniquement).

2.7. Analyses immunohistochimiques

2.7.1. Immunohistochimie et immunofluorescence sur tissus de souris

Pour l'immunohistochimie, les coupes flottantes de 35 μm ont été rincées trois fois 10 minutes dans du PBS Triton X-100 0,2% (PBS-TX afin de perméabiliser les membranes) puis incubées pendant 30 minutes avec une solution d' H_2O_2 à 0,3% (pour inhiber les peroxydases endogènes). Après 3 rinçages de 10 minutes au PBS-TX, les coupes ont été saturées par du sérum de souris (Mouse-on-Mouse, Vector MKB2213) ou de chèvre (S1000, Sigma) dilués au 1/100ème dans du PBS-TX pendant une heure à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires (Tableau 4 page 114) dirigés contre le $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ murin (1/2500, anticorps polyclonal réalisé chez le cochon d'inde, Af1000, Frontier institute, Japon), une conformation pathologique de tau (MC1) (1/1000, anticorps monoclonal réalisé chez le lapin, donné par Peter Davies), la choline acétyl transférase (ChAT, 1/2000, polyclonal lapin, AB143, Merck) et la protéine du complément C1q (1/10 000, polyclonal lapin, ab182451, Abcam) pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Pour l'immunohistochimie $\text{A}\beta$, les coupes ont été prétraitées avec de l'acide formique 80% pendant 3 minutes et ont été perméabilisées avec du tampon phosphate sodium/Triton X-100 0,2%. Les coupes ont ensuite été saturées dans 10% de sérum « mouse on mouse » (Vector Laboratories) pendant 1 heure avant incubation avec un anticorps anti- $\text{A}\beta$ (6E10) à 4°C pendant une nuit. Après rinçage au PBS, les anticorps secondaires biotinylés (1/500, Vector) ont été incubés pendant une heure à température ambiante. La révélation a été réalisée par la méthode ABC (Vector Laboratories), basée sur la formation de complexes avidines-biotines, puis révélée par le substrat de peroxydase 3'3-diaminobenzidine (DAB, Sigma) (10 mL de DAB, 10 mL de tris 0,1M pH 7,6, 30 μL d' H_2O_2 30 %) jusqu'à l'apparition d'une coloration marron.

Pour l'immunofluorescence, les coupes flottantes de 35 μm ont été rincées trois fois 10 minutes dans du PBS-TX 0,2% puis saturées dans du sérum de souris (Mouse-on-Mouse, Vector MKB2213) ou de chèvre (S1000, Sigma) dilués au 1/100ème dans du PBS-TX pendant une heure à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires (Tableau 4 page 114) dirigés contre la tau totale (TauE1E2, 1/500, monoclonal souris, anticorps généré au laboratoire), NeuN (1/500, monoclonal souris, MAB377, Millipore), Iba1 (1/500, polyclonal IgG chèvre, ab5076, Abcam), GAD67 (1/400, monoclonal souris clone 1G10.2, MAB5406, Millipore), GFAP (1/500, polyclonal IgG lapin, Z0334, Dako), S100 β (1/1000, monoclonal souris, S2532, Sigma-Aldrich), et la doublecortine (DCX, 1/500, polyclonal chèvre, sc8066, Santacruz) pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Les anticorps secondaires suivant couplés à un fluorophore ont été utilisés : Alexa Fluor488,

Alexa Fluor568 and Alexa Fluor647 (1/500, Life Technologies), et ont été incubés pendant une heure à température ambiante. Les coupes ont également été marquées avec du DAPI (1/5000, 62248, ThermoScientific). Les coupes ont été montées avec le milieu de montage Dako Fluorescent. Les images ont été acquises avec un microscope Leica ICC50 HD, un axioscan Z1 et un microscope confocal Zeiss LSM710. Les reconstructions en 3D des images du confocal ont été réalisées sur le logiciel Imaris (Bitplane, USA).

Concernant les marquages VGAT et VGLUT1, les coupes ont été incubées dans un milieu de saturation et de perméabilisation (PBS 0,1M, sérum de chèvre 5%, Triton X-100 0,5%, NaN₃ 0,02 %) pendant 4 heures à température ambiante. Les coupes ont été rincées 3 fois dans du PBS pendant 15 minutes à température ambiante, et ensuite incubées 48 heures à 4°C avec un anticorps primaire anti-VGAT (1/500, polyclonal lapin, donné par Bruno Gasnier) et anti-VGLUT1 (1/500, guinea pig, Synaptic systems). Les coupes ont été rincées 3 fois et incubées à température ambiante avec les anticorps secondaires suivants : Alexa647 et Alexa488 (1/500 dans du PBS azide, Jackson ImmunoResearch). Les coupes immunomarquées ont été rincées dans du PBS et incubées avec du DAPI (100 ng/ml) dans du PBS pendant 30 minutes. Pour l'analyse quantitative, les images en plan unique ont été réalisées sur un microscope confocal Leica SP5 utilisant un objectif X63 1.40 NA immergé dans l'huile et scannées avec les lasers à 647, 488 et 405nm. Les images ont été acquises en nuance de gris 8bit 1024x1024 pixels avec chaque pixel de 0,241µm.

2.7.2. Analyses des images

2.7.2.1. Quantification des immunohistochimies

Les coupes ont été digitalisées grâce à un scanner de lames (Axioscan, Zeiss). Les images obtenues ont été converties dans un format exportable (.tiff) à l'aide du logiciel ZEN. L'analyse a été réalisée grâce au le logiciel ImageJ. Brièvement, les images ont été converties en format 8 bits puis un seuil de marquage (*threshold*) a été réalisé afin d'évaluer le pourcentage de surface marquée par le marquage MC1 (*Figure 42A et B*). Pour chaque coupes, d'autres paramètres ont été récupérés comme la surface de l'hippocampe total (µm²) ainsi que l'épaisseur des couches CA1 et gyrus denté (µm).

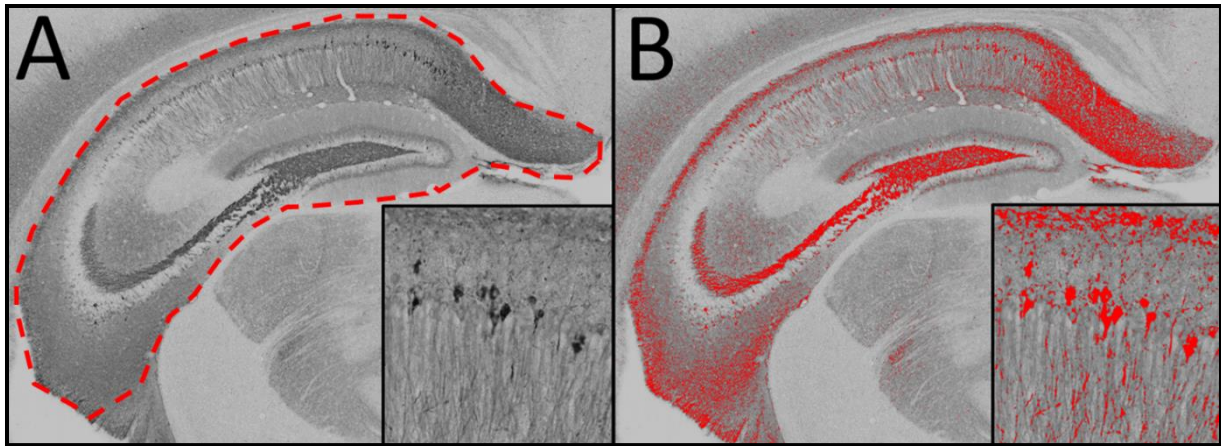


Figure 42 : Exemple de quantification par seuil de marquage (MC1). Quantification du marquage immunohistochimique MC1. (A) Exemple de coupe convertie en niveau de gris 8-bit et utilisée pour mesurer la surface et le % de surface hippocampique marqué par l'anticorps MC1. (B) Seuil appliqué afin de mettre en évidence le marquage somato-dendritique des neurones.

2.7.2.2. Quantification du nombre et de la morphologie des cellules microgliales

Pour l'analyse du nombre et de la morphologie des cellules microgliales, un marquage fluorescent anti-Iba1 a été réalisé et les images ont été prises au 20X sur un microscope confocal Zeiss LSM710. Les quantifications ont respectivement été réalisées sur 12 et 8 images confocales par animal des régions CA1 et gyrus denté, en utilisant un plugin personnalisé sur ImageJ. Brièvement, les images confocales ont été divisées en 8 sous-couches (dans l'axe z) et pré-traitées en utilisant une augmentation de contraste (saturation de 0,4 %). Les sous-couches ont été traitées par ImageJ afin d'obtenir une image binaire avec les fonctions suivantes : (1) Retrait du bruit de fond (*Subtract Background* ; paramètres : *rolling, 50 px corresponding to 7,44 μm*), (2) Amélioration du contraste (*Enhance Contrast* ; paramètres : *0,4 % saturated, normalize*), (3) Conversion en 8 bits (*Convert to 8-bit*), (4) Seuil appliqué automatiquement (*Auto Local Threshold* ; paramètres : *method Bernsen, radius = 15 px corresponding to 2,23 μm, parameter1 = 0, parameter2 = 0, white objects on black background*), (5) Remplir les espaces vides (*Fill Holes*). Des ellipsoïdes en 3D de diamètre 1,2 μm (axe x et axe y) et 1,0 μm (axe z) ont été insérées sur l'image l'image binaire à chaque position de pixel. Si tous les pixels d'une ellipsoïde étaient positifs (c'est-à-dire marqués par du signal anti-Iba1), alors l'ellipsoïde était reportée sur une nouvelle image vierge de mêmes dimensions, à une valeur d'intensité maximale. Ainsi, chaque particule 3D reportée correspondait au nombre de soma microglial et a été quantifié sur cette nouvelle image. Cette détection automatique de soma microgliaux a été vérifiée en aveugle, et corrigé manuellement si nécessaire.

L'analyse de la morphologie microgliale en 3D a été réalisée via un plugin ImageJ personnalisé, similaire à celui précédemment décrit (Plescher *et al.*, 2018). Les images confocales ont été divisées en sous-couches et pré-traitées en utilisant une augmentation de contraste de 0,1% et un flou gaussien (sigma 2.0). Les images binaires segmentées ont été générées automatiquement. A cette fin, un seuil d'intensité a été calculé individuellement pour chaque image en 8 bit en utilisant l'algorithme « Li » (*0,5-fold scaled maximum intensity projection*) et appliqué sur les images empilées pré-traitées. Les images binaires ont ensuite été filtrées en utilisant un filtre à particules 3D, ne gardant que les particules d'un volume supérieur à 13 000 voxels, correspondant à $231,45 \mu\text{m}^3$. La morphologie des objets 3D restants (c'est-à-dire les cellules microgliales individuelles) et leurs squelettes cellulaires ont ensuite été analysés sur les paramètres suivants : index de ramification (ratio entre la surface cellulaire et le volume cellulaire), longueur totale de l'arbre dendritique (longueur totale de toutes les branches cellulaires) et le volume surveillé par chaque cellule (*spanned volume*). Un filtre gaussien (sigma 1.0) a été appliqué avant la formation du squelette. Les objets 3D segmentés d'un volume supérieur à $1400 \mu\text{m}^3$ représentent des doublets ou des triplets de cellules microgliales, et ont été exclues des analyses. Egalement, seules les cellules dont le soma se trouve à une distance de plus de $20 \mu\text{m}$ des bords dans l'axe x et y et entre 4 et $6 \mu\text{m}$ de la profondeur dans l'épaisseur (axe z) ont été gardées pour l'analyse, afin d'exclure les cellules tronquées à proximité des bords. Ainsi, approximativement 250 cellules microgliales individuelles ont été dénombrées sur l'ensemble des images par animal dans la CA1 et 150 dans le gyrus denté.

2.7.2.3. Quantification de la densité synaptique

Pour la quantification VGAT et VGLUT1, différentes régions d'intérêts (*regions of interest*, ROI) ont été déterminées dans les couches moléculaires et le hilus du gyrus denté. La quantification a été réalisée dans cette ROI en utilisant le logiciel MetaMorph (Roper Scientific). Les différentes couches (*stacks*) ont été empilées en une seule image (*max intensity projection*) et le bruit de fond a été retiré (taille de kernel, 3X3X2) afin d'améliorer les bords des clusters, et un seuil d'intensité a été appliqué automatiquement et confirmé visuellement afin de sélectionner les groupements de marquage et éviter leur fusion entre eux. Le nombre total de groupements VGAT ou VGLUT1 pour chaque ROI (nombre total sur $581 \mu\text{m}^2$) a été quantifié.

2.8. Electrophysiologie

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale, puis le cerveau a été extrait de la boîte crânienne et les hippocampes disséqués dans une solution de Krebs à 4°C (NaCl 124 mM, KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ 26 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM et glucose 10 mM) précédemment gazée dans de l'O₂ 95 % et du CO₂ 5 %, à pH 7,4. Les coupes d'une épaisseur de 400 µm ont été obtenues avec un vibratome McIlwain, puis laissées dans la solution de Krebs pendant une heure afin de se stabiliser. Les potentiels de champs excitateurs postsynaptiques (fEPSPs) ont été enregistrés comme précédemment décrits dans la CA1 de la couche *stratum radiatum* (Batalha *et al.*, 2013). La molécule pharmacologique SCH 58261 (50nM), un antagoniste sélectif du A_{2A}R, a été ajoutée dans la solution de Krebs (3 mL/min) après qu'un niveau d'enregistrement de base, stable pendant 30 min, ait été obtenu.

3. Expériences réalisées sur les cultures primaires d'astrocytes

3.1. Cultures cellulaires d'astrocytes primaires

3.1.1. Préparation des cultures

Les cultures d'astrocytes primaires ont été réalisées dans le laboratoire de Tiago F. Outeiro à Gottingen, en Allemagne. Celles-ci ont été préparées à partir de souriceaux, un à quatre jours après la naissance. Après décapitation, les cerveaux ont été placés dans un milieu « *Hank's Balanced Salt Solution* » (HBSS) à 4°C (sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) puis le cortex a été isolé et les méninges ont été retirées. Le tissu a été digéré via l'ajout d'une solution de trypsine à 0,05 % diluée dans du HBSS et laissée à 37°C pendant 15 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées 2 à 3 minutes à température ambiante dans du milieu « *Dulbecco's Modified Eagle Medium* » (DMEM) contenant de la gentamycine 1 %, du fungizone 1 % et du sérum de veau fœtal 10 %, puis broyées afin d'obtenir un homogénat cellulaire qui a ensuite été centrifugé à 800 tours/min pendant 2 minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot a été resuspendu dans du DMEM contenant de la gentamycine 1 %, du fungizone 1 % et du sérum de veau fœtal 10 %. Les cellules issues de trois cerveaux ont été placées dans des flasques de 175 cm² et dans un volume de milieu DMEM de 50 mL. Cette culture mixte astrocytaire a ensuite été incubée à 37°C avec 5 % de CO₂ pendant trois jours. Lors du 3^{ème} jour *in vitro* (*day in vitro* 3, DIV3), le milieu a été changé. A DIV10, la culture mixte a été agitée à 320 tours/min à 37°C durant une nuit. Les cellules attachées restantes ont été rincées avec du PBS à 37°C et détachées à l'aide d'une solution de trypsinisation modérée (PBS, trypsine 0,25 %)

à 37°C pendant 3 à 5 minutes. Le milieu de culture DMEM a ensuite été ajouté pour arrêter l'action de la trypsine, et les cellules en suspension ont été collectées et centrifugées à 1000 tours/min pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été resuspendu dans le milieu et les cellules ont été comptées. Ensuite, les cellules ont été remises en culture dans du milieu frais sur plaques ou lamelles (pour immunocytofluorescence) recouvertes de poly-L-lysine, à une densité respective de 1.10^6 cellules/mL ou 5.10^4 cellules/mL. Les astrocytes primaires ont ensuite été laissés en culture pendant 48 heures avant que les expériences ne soient démarrées.

3.1.2. Infections des cultures primaires d'astrocytes

Afin de générer des cellules surexprimant le $A_{2A}R$, les cultures d'astrocytes primaires ont été infectées à DIV7 avec des quantités équimolaires de lentivirus induisant l'expression soit du $A_{2A}R$ murin soit de la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP) comme contrôle. Le SCH 58261, antagoniste sélectif du $A_{2A}R$ (Tocris Bioscience), a été appliqué sur les cultures primaires d'astrocytes à DIV12 à une concentration finale de 100nM et les cellules ont été collectées après 24 heures de traitement (DIV13).

3.1.3. Evaluation du métabolisme et de la cytotoxicité

Un test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et un test ToxiLight (basé sur la libération d'adénylate kinase) (Lonza) ont été utilisés afin d'évaluer, respectivement, le métabolisme cellulaire et la viabilité, en suivant les recommandations du fournisseur. Les mesures de ces deux tests ont été réalisées via un lecteur spectrophotomètre de microplaques (Infinite M200 fluorescence plate reader, Tecan, Hamburg, Germany).

3.2. Analyses transcriptionnelles

3.2.1. Séquençage de l'ARNm

Les ARN totaux ont été extraits six jours après infection et 24 heures après traitement au SCH 58261 en utilisant le TRIzol Reagent (Thermo Fischer Scientific) et le kit NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel), en suivant les recommandations du fournisseur. Cette technique est basée sur la séparation phénol-chloroforme-isothiocyanate de guanidine. La préparation de la librairie et le séquençage du RNAseq ont été réalisés au Transcriptome and Genome Analysis Laboratory, NGS-Core Unit of the University Medical Center de Göttingen. La qualité et l'intégrité des ARN ont été évaluées avec un analyseur de fragments d'Advanced Analytical en utilisant le kit d'analyse standard (DNF-471). Tous les échantillons sélectionnés pour le séquençage présentaient une intégrité supérieure à 8 sur 10. Les librairies du RNAseq

ont été réalisées à partir de 500 ng d'ARN total et séquencées par un Illumina (TruSeq RNA Library Preparation Kit v2, Set A; 48 échantillons, 12 indexages, Cat. N°RS-122-2001). De façon plus spécifique, l'étape de ligation a été optimisée en diluant les adaptateurs afin d'améliorer l'efficacité de la ligation (> 94 %) et finalement de réduire le nombre de cycles PCR (10 cycles) afin d'éviter la duplication PCR d'artéfacts ainsi que de dimères d'amorces dans le produit final de la librairie. Les librairies ont été préparées par des automates (*Beckman Coulter's Biomek FXP workstation*). Afin de réaliser une quantification précise des librairies de cDNA, un système basé sur la fluorométrie, le QuantiFluor™dsDNA (Promega) a été utilisé. La taille des librairies finales des ADN complémentaires a été déterminée en utilisant le kit dsDNA 905 Reagent Kit (via l'analyseur de Fragment d'Advanced Bioanalytical) avec une taille moyenne de 300 paires de bases (300 bp). Les librairies ont ensuite été mélangées et séquencées dans l'Illumina HiSeq 4000 (SE; 1 x 50 bp; 30-35 millions de lecture/échantillon). Le séquençage de l'ARNm a été réalisé sur quatre cultures indépendantes (portées différentes) pour chaque groupe.

Les images issues du séquenceur ont été transformées par le logiciel Illumina BaseCaller en fichiers BCL, qui ont été démultiplexées en fichiers Fastq avec Bcl2fastq v2.17.1.14. La vérification de la qualité a été réalisée en utilisant FastQC (2014, version 0.11.5, Babraham Bioinformatics, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

3.2.2. Analyses du séquençage de l'ARNm

L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée comme précédemment décrite (Halder *et al.*, 2016). Brièvement, les données du séquençage ont été transformées en utilisant une suite de logiciels personnalisés. Le logiciel bcl2fastq (version 1.8.4) d'Illumina a été utilisé afin de convertir les « *base calls per cycle* » des fichiers BCL en « *per read* » au format FASTQ depuis les images brutes. Parallèlement au processus d'attribution de bases de l'ADNc aux pics de chromatogramme, le retrait des adaptateurs et le démultiplexage ont été réalisés. Afin de vérifier la qualité des données de séquences brutes, FastQC (v 0.11.5) a été utilisé. Les séquences lues (« *reads* ») ont été alignées sur le génome de la souris (Mus_musculus.GRCm38.86) en utilisant le logiciel rna-STAR (version STAR_2.5.2b) (Dobin & Gingeras, 2015) dans un mode « *non splice junction aware* » et tous les autres paramètres ont été mis par défaut par rna-STAR. Afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés, les sources de variations non désirées ont été identifiées et retirées en utilisant RUVSeq tool (Remove Unwanted Variations, RUVs, v. 1.8.0). Ensuite, le logiciel DESeq2 (version 1.14.1) (Love *et al.*, 2014) a été utilisé afin de réaliser les expressions différentielles.

3.2.3. Rétrotranscription et PCR quantitative (qPCR)

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules et purifiés en utilisant le kit NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel). La rétrotranscription a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN total en utilisant le kit HighCapacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems). Les analyses par qPCR ont été réalisées sur l'appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) en utilisant du Power SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les conditions des cycles de températures ont été les suivants : 95°C pendant 10 minutes, ensuite 40 cycles de 95°C pendant 15 secondes puis 60°C à 25 secondes. Une courbe de fusion a été réalisée à la fin des 40 cycles, de 60 à 95°C avec un incrément d'un degré de température. Les séquences des primers utilisées dans cette étude sont fournies dans le

Tableau 6. Le gène de référence Cyclophilin A a été utilisé pour la normalisation des résultats. Les amplifications ont été réalisées en duplicat et l'expression relative du gène d'intérêt a été déterminé par la méthode $\Delta\Delta C_t$.

	Forward Primer	Reverse Primer
Scg2	GCTTGGAGCCTTCCACATAA	GCCTTAGCTCCAGCCATGT
Chi311	GACCCTGGCCTACTACGAGA	TTGGTAGCGAAGGGAACCT
I11β	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
Adora2a	CTGCTTTGTCCTGGTCCTCAC	ATACCCGTCACCAAGCCATT
Gfap	CGCGAACAGGAAGAGCGCCA	GTGGCGGGCCATCTCCTCCT
Vim	CCAACCTTTTCTTCCCTGAAC	TTGAGTGGGTGTCAACCAGA
Slc7a11	TTGAACATTTCTCTTAGTAAGCATGG	TGGACACTCATGACCTCACAA

Tableau 6 : Liste des primers utilisés dans l'étude *in vitro*.

3.3. Analyses biochimiques par immuno-empreinte

Afin de réaliser une quantification des protéines, les astrocytes ont été lysés dans un tampon RIPA (Triton X-100 0,1 %, NaCl 0,15 M, Tris 50 mM, pH 7,5 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche)). La quantité de protéine présentes dans le lysat a ensuite été déterminée via un test de Bradford (Bio-Rad) dans un Infinite M200 PRO plate reader (Tecan Lta). Les échantillons ont été mixés avec du tampon Laemmli 5X (Tris 250 mM, sodium dodécyl sulfate 10 %, bleu de bromophénol 1,25 %, β-mercaptoethanol 5 %, glycérol 50 %, pH 6,8), chauffés 5 min à 95°C puis chargés sur un gel de sodium dodécyl sulfate

polyacrylamide (SDS-PAGE). Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocelluloses avec un système de transfert semi-sec (Tans-Blot® Turbo™ blotting system). Les membranes ont ensuite été bloquées avec une solution de saturation à base de Tris Base 1 % et de Tween 0,05 % (TBST) contenant 5 % de lait de vache reconstitué, durant une heure à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps suivants : anti-GFAP 1/1000 (Santa Cruz, sc33673, souris), anti-A_{2A}R murin 1/1000 (Fronter Institute, Af1000, cochon d'inde), anti-SCG2 (Secretogranin II/Chromogranin C) 1/1000 (un don de la part de Maité Montero, Université de Rouen, Normandie, France, lapin), et anti-actine β 1/1000 (Sigma, Mouse), tous dilués dans la solution de saturation durant une nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire (IgG (H+L) couplé à une activité peroxydase HRP (horseradish peroxidase)) au 1:10 000^{ème} (anti-souris ou anti-lapin, GE Healthcare), pendant 2h à température ambiante. Entre chaque étape, les membranes ont été rincées 3 fois dans du TBST, pendant 5 min à température ambiante. Les membranes ont été révélées en utilisant un substrat HRP Immobilon Western Chemiluminescent (Millipore Corporation) et le signal chemiluminescent a été détecté en utilisant l'appareil Fusion FX (Vilber Lourmat). La quantification des bandes a été réalisée en utilisant le logiciel Image J.

3.4. Analyses par immunofluorescence

Les cellules cultivées sur lamelles ont été fixées en utilisant du paraformaldéhyde à 4 % à température ambiante pendant 15 minutes. Une solution de PBS a été utilisée pour rincer les cellules qui ont ensuite été perméabilisées via une solution PBS/Triton 0,1 % pendant 15 minutes à température ambiante. Après saturation dans une solution PBS/albumine de sérum bovin (BSA) 3 % à température ambiante pendant 1 heure, les cellules ont été incubées durant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : anti-A_{2A}R 1:1000 (Fronter Institute, Af1000, cochon d'inde), anti-GFAP 1:1000 (DAKO, z0334, lapin), anti-MBP 1:1000 (BioLegend, 808402, souris), anti-III β-tubulin (anticorps TUJ1) 1:1000 (Covance, MMS-435P-250, souris), anti-NeuN 1:1000 (Millipore, MAB377, souris), anti-O4 (clone 81) 1:1000 (Millipore, MAB345, souris), anti-Iba1 1:1000 (Abcam, ab5076, chèvre), and anti-CD31 (anticorps PECAM-1) 1:1000 (BD Pharmingen, 550274, souris), dilués dans la solution de saturation. Les cellules ont été rincées dans du PBS et ensuite incubées avec un anticorps secondaire Alexa Fluor (anti-souris ou anti-lapin, 488 ou 555, Life Technologies), préparé au 1:1000 dans la solution de saturation, durant 2 heures à température ambiante. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI et les lamelles ont ensuite été montées avec du

Mowiol. Les images d'immunofluorescence utilisées pour déterminer le pourcentage relatif de chaque type cellulaire dans la culture ont été acquises sur un microscope d'épifluorescence Olympus IX81-ZDC (Olympus) avec un objectif de grossissement de 40X ou un microscope d'épifluorescence Leica DMI 6000B (Leica) avec un objectif de grossissement de 10X. Les images de hautes résolutions ont été acquises en utilisant un module Zeiss Airyscan placé sur un microscope confocal LSM710 (Zeiss, Carl Zeiss-Strasse 22 73447 Oberkochen, Germany). L'Airyscan est capable d'atteindre une résolution de 140nm le long de l'axe x-y et 400nm le long de l'axe z en utilisant la lumière qui d'ordinaire est rejeté par le sténopé (« pinhole ») du confocal et augmente le ratio signal sur bruit. C'est un assemblage de 32 détecteurs de gallium arsenide phosphide (GaAsP) disposés en forme d'œil.

4. Analyses statistiques.

L'ensemble des données sont représentées en moyenne \pm écart type standard à la moyenne (sem). Les résultats *in vitro* sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes, sauf si précisé différemment (cf. Résultats Partie III). En fonction des expériences et du nombre de groupes considérés, les résultats ont été analysés par le test de Student, par One-Way ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples (*post-hoc*) HSD de Tukey (cf. Résultats Partie I) ou LSD de Fisher (cf. Résultats Parties II à IV). Les différences entre plus de 3 groupes sur plusieurs jours ont été déterminées par Two-way ANOVA. Ces statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism 8. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme significative.

RESULTATS

Afin de faciliter la lecture tout au long des différentes parties de résultats, la nomenclature suivante a été utilisée : les astrocytes surexprimant le récepteur A_{2A} sont notés « **A_{2A}R_{Astr}** » et les neurones surexprimant le récepteur A_{2A} « **A_{2A}R_{Neur}** ». Par ailleurs, le code couleur suivant a été utilisé dans les figures : les souris THY-Tau22 (abréviées sous le terme « Tau ») sont représentées par la **couleur bleue**, les souris APP^{sw}/PS1^{dE9} (abréviées sous le terme « APP/PS1 ») sont représentées par la **couleur violette**, et le blocage pharmacologique du A_{2A}R est représenté par la **couleur orange**.

Partie I : Surexpression neuronale du récepteur A_{2A} dans un modèle de tauopathie

Les résultats présentés dans cette partie ont donné lieu à une publication : Carvalho*, Faivre* *et al.*, Brain 2019 *sous presse* (cf. Annexes).

1. Expression du A_{2A}R chez les patients atteints de FTLD-tau (*MAPT* P301L)

Tout d'abord, en vue de mieux comprendre le lien potentiel entre la dysrégulation du A_{2A}R et la pathologie tau, nous avons évalué la quantité de A_{2A}Rs dans des cerveaux humains issus de patients atteints de dégénérescences lobaires fronto-temporales (FTLD-tau), portant une mutation P301L du gène de tau, *MAPT*. D'une part, les analyses biochimiques démontrent une augmentation significative de la densité des A_{2A}Rs dans le cortex temporal des patients FTLD-tau par rapport à des individus contrôles d'âge similaire (Figure 43A). D'autre part, nous avons mis en évidence par immunofluorescence que les neurones avec une pathologie tau (positifs au marquage anti-AT8, indiqué par une flèche) possèdent un marquage anti-A_{2A}R d'intensité plus forte que celui des neurones sans pathologie tau (négatif au marquage anti-AT8, indiqué par une astérisque) (Figure 43B). En conséquence, ces données suggèrent un lien entre le développement de la pathologie tau et l'augmentation neuronale du A_{2A}R. Afin d'étudier ce lien, nous avons ensuite eu recours à des modèles transgéniques murins.

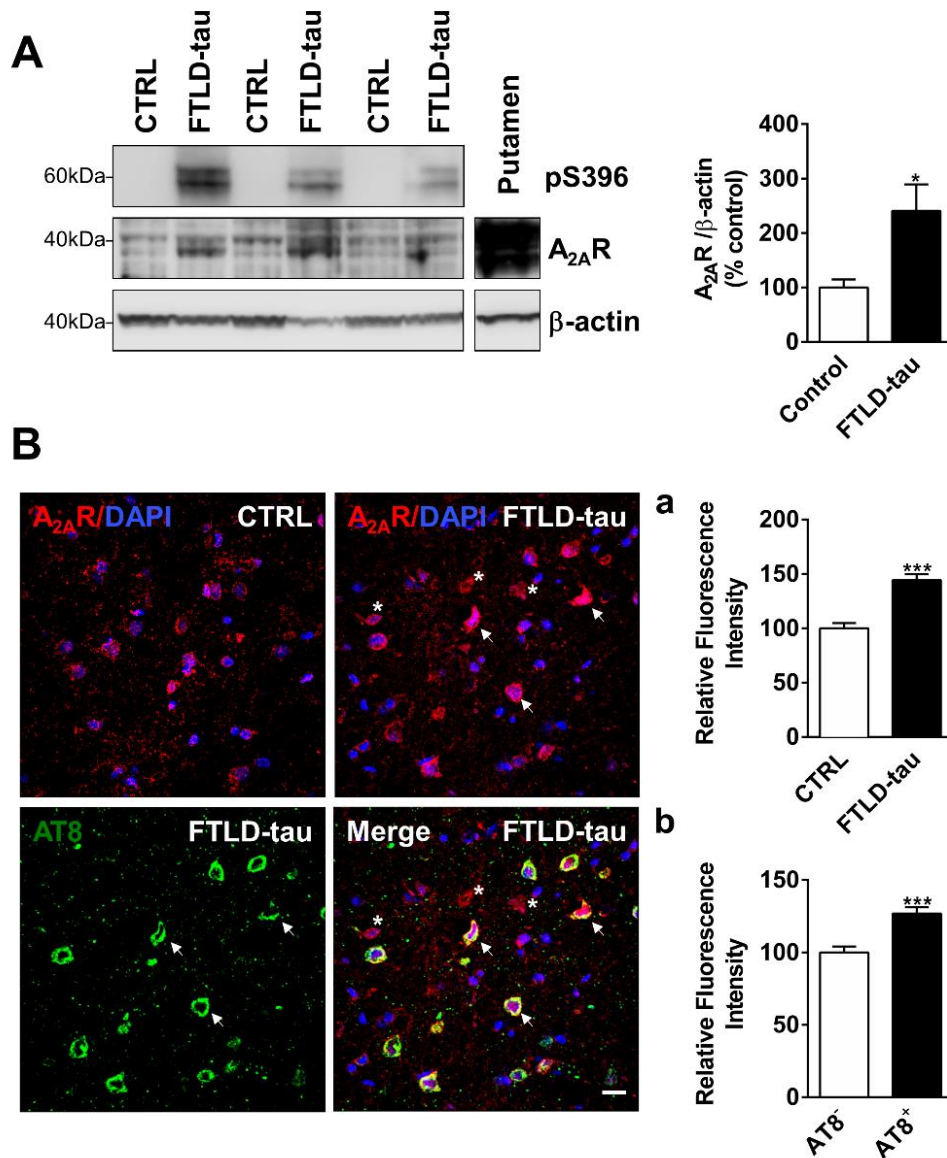


Figure 43 : L'expression du A_{2A}R est augmentée dans le cortex temporal des patients atteints de dégénérescence lobaire fronto-temporale (FTLD-tau) associée à une mutation P301L du gène de tau, *MAPT*. (A) Immuno-empainte de la phosphorylation de Tau sur l'épitope Ser396 et de la quantité du A_{2A}R dans le cortex des patients FTLD-tau et sujets contrôles d'âges similaires (CTRL). Les résultats montrent une augmentation attendue de phosphorylation de tau et de quantité du A_{2A}R chez les patients FTLD-tau. * $p < 0,05$ vs. CTRL en utilisant le test de Student, N = 3 par groupe. Le putamen a été utilisé comme contrôle positif pour le A_{2A}R. (B) Immunofluorescence avec anticorps dirigés contre le A_{2A}R (rouge) et la tau phosphorylée (AT8, vert) dans le cortex temporal des mêmes patients FTLD-tau et sujets contrôles. L'intensité du signal a d'abord été mesuré dans cellule isolée marquée par l'anticorps anti-A_{2A}R (rouge) détectées chez les contrôles (N = 1616 cellules) et chez les patients FTLD-tau (N = 2153 cellules) sur 9-11 régions d'intérêts par individus, représentant N = 29-30 images par groupe. L'évaluation quantitative en immunofluorescence indique une augmentation des niveaux de A_{2A}R cellulaire dans le cortex temporal des patients FTLD-tau. De plus, chez les patients FTLD-tau, l'intensité du signal anti-A_{2A}R a été comparée entre les neurones présentant une pathologie tau (marquage anti-AT8 positif, indiqué par une flèche, N = 370) et les neurones sans pathologie tau (marquage anti-AT8 négatif, indiqué par une astérisque, N = 1818) sur 9-11 régions

d'intérêts par individus représentant 30 images par groupe. Les analyses ont révélé une augmentation de l'intensité du signal A_{2A}R dans les neurones avec pathologie tau. Le DAPI (en bleu) représente les noyaux cellulaires. ***p<0,001 vs CTRL en utilisant le test de Student. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart standard à la moyenne (sem). Echelle = 20 µm. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

2. Caractérisation d'un modèle murin de surexpression neuronale du A_{2A}R

Dans le but d'évaluer l'impact d'une augmentation neuronale du A_{2A}R sur le développement de la pathologie tau et des troubles cognitifs associés, nous avons développé un modèle de souris transgéniques permettant la surexpression conditionnelle du A_{2A}R dans les neurones (Figure 44A). Cette augmentation neuronale du A_{2A}R est obtenue par le croisement d'une nouvelle lignée de souris possédant le transgène A_{2A}R murin sous contrôle d'un élément de réponse (Tet-responsive element, lignée TRE-A_{2A}R) avec un modèle transgénique exprimant une protéine transactivatrice tTA (*tetracycline-controlled transactivator protein*) sous le promoteur neuronal CaMKII α (lignée CaMKII-tTA ; Figure 44A). Afin d'éviter tout effet pendant la période critique du développement périnatal, l'expression du transgène du A_{2A}R est bloquée, de l'accouplement jusqu'au sevrage des souriceaux (28^{ème} jour après la naissance, P28) par un traitement à la doxycycline (Dox). Comme attendu, les A_{2A}Rs endogènes sont particulièrement enrichis dans le striatum (Blum *et al.*, 2003), ce qui est observé dans les souris contrôles de portée (« WT ») ainsi que dans les souris doubles transgéniques CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R sous traitement à la doxycycline (« P28 avec Dox » Figure 44C, au milieu). Lorsque l'accouplement est réalisé en l'absence de doxycycline (« P28 sans Dox » ; Figure 44B et C, à gauche) ou chez des animaux non traités à la doxycycline depuis 5 mois après l'avoir retiré à partir 28^{ème} jour après la naissance (« 5 mois après retrait Dox » ; Figure 44B et C, à droite), le transgène du A_{2A}R est retrouvé très exprimé dans d'autres régions du cerveau des souris doubles CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R, mais pas dans les souris WT, particulièrement dans le cortex et l'hippocampe (Figure 44B et C).

Afin de s'assurer de la spécificité cellulaire de la surexpression du A_{2A}R induite par le système transgénique, nous avons réalisés différents co-marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs de neurones (NeuN), d'interneurones (GAD67), de cellules microgliales (Iba1) et d'astrocytes (GFAP, S100 β). Ces résultats montrent que la surexpression du A_{2A}R dans l'hippocampe est limitée exclusivement aux neurones pyramidaux et granulaires (Figure 45A), mais n'est pas retrouvée dans les interneurones GABAergiques (Figure 45B). Les A_{2A}Rs surexprimés ne sont également pas

retrouvés dans les précurseurs neuronaux au sein du gyrus denté, marqués par un anticorps anti-doublecortine (Figure 45C).

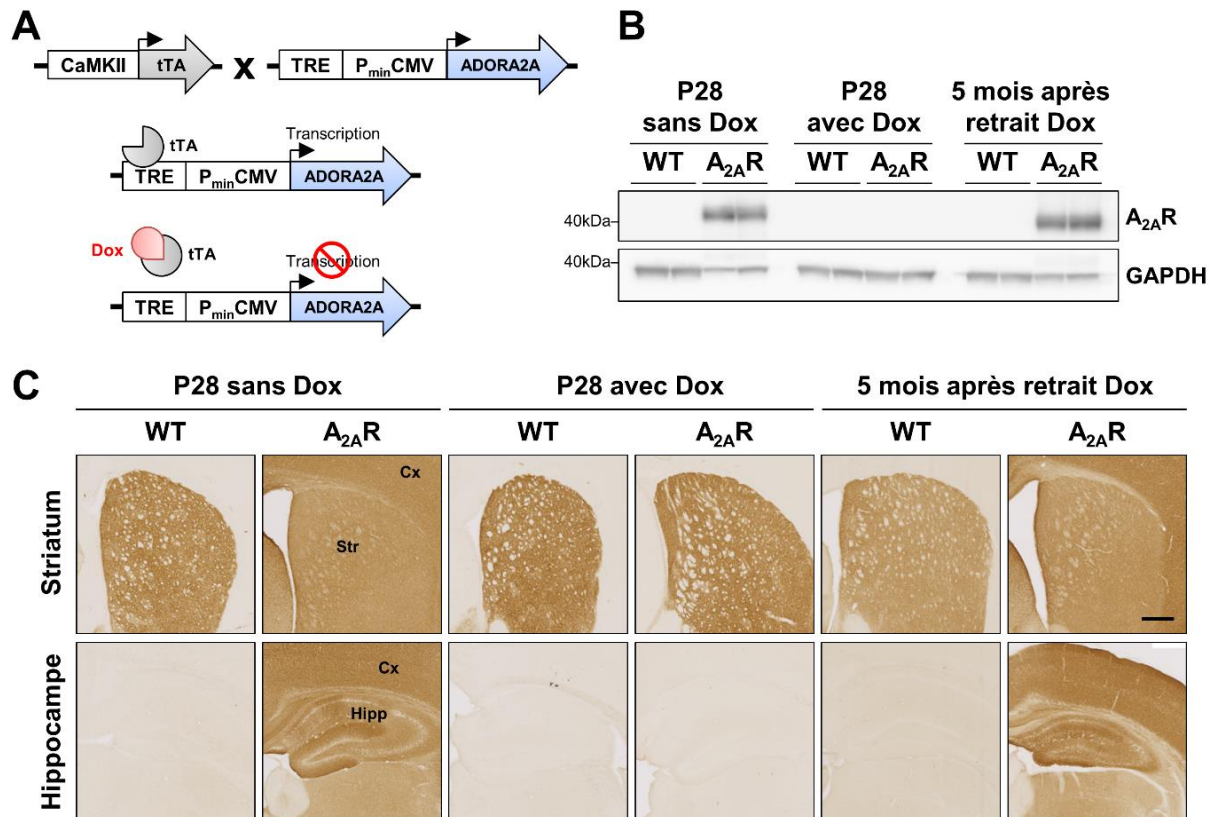


Figure 44 : Caractérisation de la surexpression du A_{2A}R dans le modèle transgénique conditionnel CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R. (A) La surexpression conditionnelle du A_{2A}R dans les neurones est obtenue par le croisement de la lignée de souris CaMKII-tTA, produisant la protéine transactivatrice de la tétracycline tTA sous contrôle d'un promoteur neuronal (CaMKII), avec la lignée de souris TRE-A_{2A}R, dans laquelle l'expression du A_{2A}R murin est sous contrôle d'un élément de réponse à la tétracycline (TRE). L'expression du A_{2A}R dans les neurones CaMKII⁺ est obtenue via la liaison de la protéine tTA au promoteur TRE. L'expression du transgène est maintenue éteinte à partir de l'accouplement et ce jusqu'au sevrage des petits au 28^{ème} jour après la naissance (P28) via la doxycycline (0,2mg/ml) dans l'eau de boisson, afin d'éviter tout effets périnataux liés à la surexpression du A_{2A}R. (B) Immunoempreintes représentatives de la densité du A_{2A}R dans l'hippocampe de souris doubles CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R (souris « A_{2A}R ») et leurs contrôles de portées (« WT »). En l'absence de doxycycline, à P28 (« P28 sans Dox », à gauche), les souris doubles transgéniques montrent une forte expression du A_{2A}R alors que dans les souris WT l'expression n'est pas détectable due à la densité relativement faible du A_{2A}R dans l'hippocampe. Le traitement avec la doxycycline durant la période périnatale abolie complètement la surexpression (« P28 avec Dox », au milieu). Après retrait de la doxycycline à P28 et la remise sous eau jusqu'à l'âge de 6 mois (« 5 mois après retrait Dox », à droite), le A_{2A}R est surexprimé dans les souris doubles transgéniques. (C) Immunohistochimie représentatives de la densité du A_{2A}R dans les mêmes conditions expérimentales. Les images du haut sont au niveau du plan anatomique du striatum et les images du bas sont au niveau du plan de l'hippocampe et du cortex. Echelle = 1 mm.

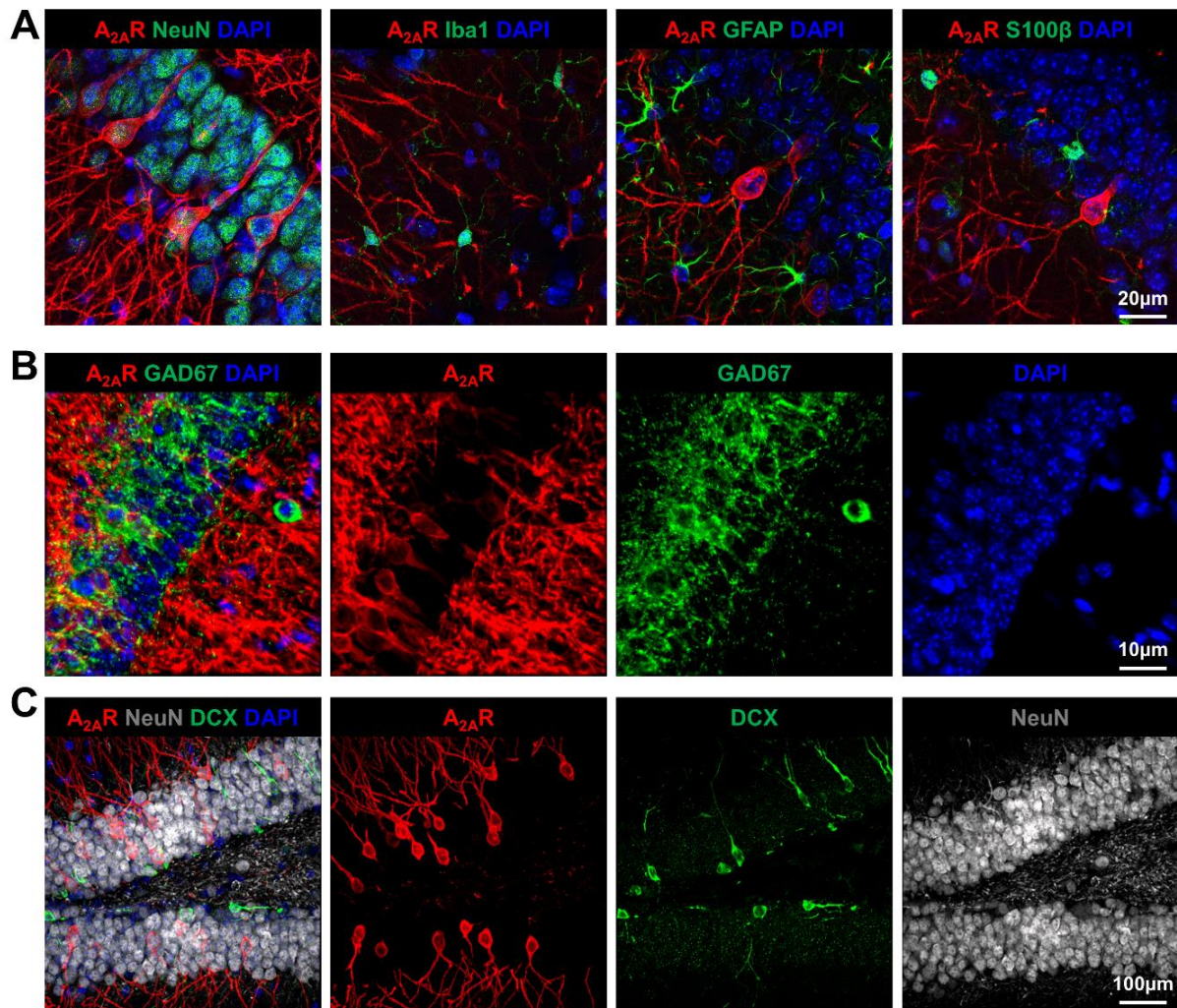


Figure 45 : Caractérisation de la spécificité cellulaire du A_{2A}R neuronal surexprimé dans le modèle de souris doubles transgéniques CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R. (A) Différents co-marquages ont été réalisés par immunofluorescence avec un marquage du A_{2A}R (rouge) et un marquage neuronal (NeuN, vert), microglial (Iba1, vert) ou astrocytaire (GFAP et S100β, vert), montrant la spécificité neuronale de la surexpression du A_{2A}R dans les souris doubles transgéniques. Le DAPI (bleu) marque les noyaux cellulaires. Echelle = 20 μm. (B) Un co-marquage du A_{2A}R (rouge) et d'un marqueur d'interneurons (Gad67, vert) montre l'absence de surexpression du A_{2A}R dans cette population cellulaire. Le DAPI (bleu) marque les noyaux cellulaires. Echelle = 10 μm. (C) Un co-marquage du A_{2A}R (rouge), d'un marqueur neuronal (NeuN, blanc) et d'un marquage de neurones immatures (Doublecortine (DCX), vert) montre que le A_{2A}R n'est pas surexprimé dans les neurones immatures. Echelle = 100 μm.

De manière à adresser l'activité synaptique des A_{2A}Rs surexprimés dans les neurones, des potentiels de champs postsynaptiques excitateurs (fEPSPs) ont été mesurés dans la région de l'hippocampe CA1 (Figure 46). Le blocage des A_{2A}Rs par l'antagoniste sélectif SCH-58261 inhibe significativement les fEPSPs. Cet effet n'est pas observé chez les souris WT. Dès lors, ces données démontrent un gain de fonction des A_{2A}Rs qui exercent un contrôle tonique sur l'activité synaptique basale des souris CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R.

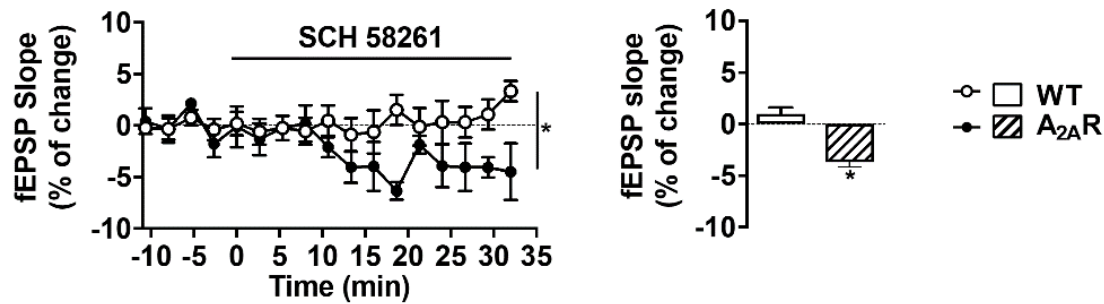


Figure 46 : Caractérisation de l'activité du A_{2A}R surexprimé. Evolution des potentiels de champs postsynaptiques excitateurs (fEPSP) après perfusion d'un antagoniste sélectif du A_{2A}R, le SCH 58261 (50 nM), pendant 30 minutes sur des coupes hippocampiques de souris WT et doubles CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R. Le SCH 58261 induit une inhibition significative des fEPSPs dans les souris doubles transgéniques suggérant un gain de fonction des A_{2A}Rs surexprimés, exerçant un contrôle tonique de la transmission synaptique basale. Ce phénomène n'est pas retrouvé chez les souris WT. *p<0,05 en utilisant le test de Student. N = 5 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

Par ailleurs, nous avons ensuite voulu explorer l'augmentation neuronale du A_{2A}R sur le développement de la pathologie tau et des troubles mnésiques associées. Dans cette optique, nous avons utilisé la lignée de souris THY-Tau22 (« Tau »), qui développe progressivement une pathologie tau hippocampique associée à des déficits de mémoire spatiale (Schindowski *et al.*, 2006; Van der Jeugd *et al.*, 2011, 2013; Burnouf *et al.*, 2013), puis nous l'avons croisé avec la lignée TRE-A_{2A}R afin d'obtenir des animaux doubles transgéniques mâles TRE-A_{2A}R/THY-Tau22. Ces derniers ont été croisés avec des femelles CaMKII-tTA afin de générer des souris triples transgéniques CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R/THY-Tau22 (« Tau/A_{2A}R_{Neur} ») et leurs contrôles de portées. Ainsi, des souris de 8 génotypes différents ont été générées puis regroupées en 4 groupes expérimentaux : les souris contrôles (CaMKII-tTA et TRE-A_{2A}R, sous le terme « WT »), les souris surexprimant le A_{2A}R neuronal (CaMKII-tTA/TRE-A_{2A}R, sous le terme « A_{2A}R_{Neur}»), les souris développant la pathologie tau (CaMKII-tTA/THY-Tau22 et TRE-A_{2A}R/THY-Tau22, sous le terme « Tau ») et enfin les souris triples transgéniques (sous le terme « Tau/A_{2A}R_{Neur} ») (cf. Figure 38, page 107). Les souris sans transgène ou avec uniquement le transgène THY-Tau22 ont été écartées des analyses.

3. Evaluation comportementale des souris Tau/A_{2A}R_{Neur}

Dans l'intention d'évaluer une potentielle accentuation des déficits mnésiques des souris Tau suite à la surexpression neuronale du A_{2A}R, ces animaux ont été évalués à l'âge de 5-6 mois. Cet âge correspond à une période précoce du développement de la pathologie tau et où

les troubles de mémoires sont absents (Van der Jeugd *et al.*, 2013). En utilisant le test d'actimétrie, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans l'activité spontanée, que ce soit en termes de vitesse ou de distance parcourue entre les différents groupes expérimentaux (Figure 47A et B). Dans un test de comportement de type « anxiété », le labyrinthe en croix surélevé, les souris tau montrent une désinhibition, passant d'avantage de temps dans les bras ouverts du labyrinthe, anxiogènes, que les souris WT, comme précédemment décrit dans la littérature (Figure 47C) (Schindowski *et al.*, 2006). Cet effet dépendant de tau n'est toutefois pas modifié par la surexpression du A_{2A}R, que ce soit dans les souris A_{2A}R_{Neur} ou Tau/A_{2A}R_{Neur}. Nous avons ensuite évalué la mémoire spatiale en utilisant le labyrinthe de Barnes. Durant la phase d'apprentissage, tous les groupes ont montré une diminution de la distance parcourue au cours des essais successifs (Figure 47D), démontrant leurs bonnes capacités d'apprentissage spatial. Seulement, au 2^{ème} jour d'apprentissage, les souris WT sont plus performantes que les trois autres groupes (A_{2A}R_{Neur}, Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur}), témoignant d'une possible altération mineure de l'apprentissage de ces trois groupes. Après l'apprentissage, une phase de rétention a été réalisée, dans laquelle la boîte d'échappement est retirée, afin d'évaluer la mémoire spatiale. Indépendamment de l'expression du A_{2A}R, les animaux WT ont une préférence nette pour le quadrant cible (Figure 47E), passant significativement une plus grande proportion de temps dans le quadrant que ce qui est attendu par le fait de la chance (>25%, Figure 47E). Toutefois, en lien avec de précédentes études (Batalha *et al.*, 2016; Temido-Ferreira *et al.*, 2018), l'augmentation neuronale du A_{2A}R réduit les performances de mémoire spatiale, en témoigne les souris A_{2A}R_{Neur} passant moins de temps dans le quadrant cible que les souris WT, même si leurs préférences pour le quadrant cible demeurent significatifs (Figure 47E).

Comme attendu à cet âge (Van der Jeugd *et al.*, 2013), les souris Tau ne montrent pas de trouble de la mémoire spatiale, avec une nette préférence pour le quadrant cible et un pourcentage de temps passé dans le quadrant cible similaire à celui des souris WT. En revanche, les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} n'ont de préférence pour aucun quadrant, avec un score similaire à celui attendu par le hasard (Figure 47E). Les souris Tau/A_{2A}R_{neur} passent également moins de temps dans le quadrant cible par rapport aux souris Tau. La latence, correspondant au temps nécessaire pour un animal d'atteindre le trou cible pour la première fois, est similaire entre les souris WT, A_{2A}R_{Neur} et Tau, mais nettement augmentée pour les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} (Figure 47F). Ces données démontrent que l'augmentation neuronale du A_{2A}R potentialise le développement des déficits de mémoire spatiale des souris THY-Tau22.

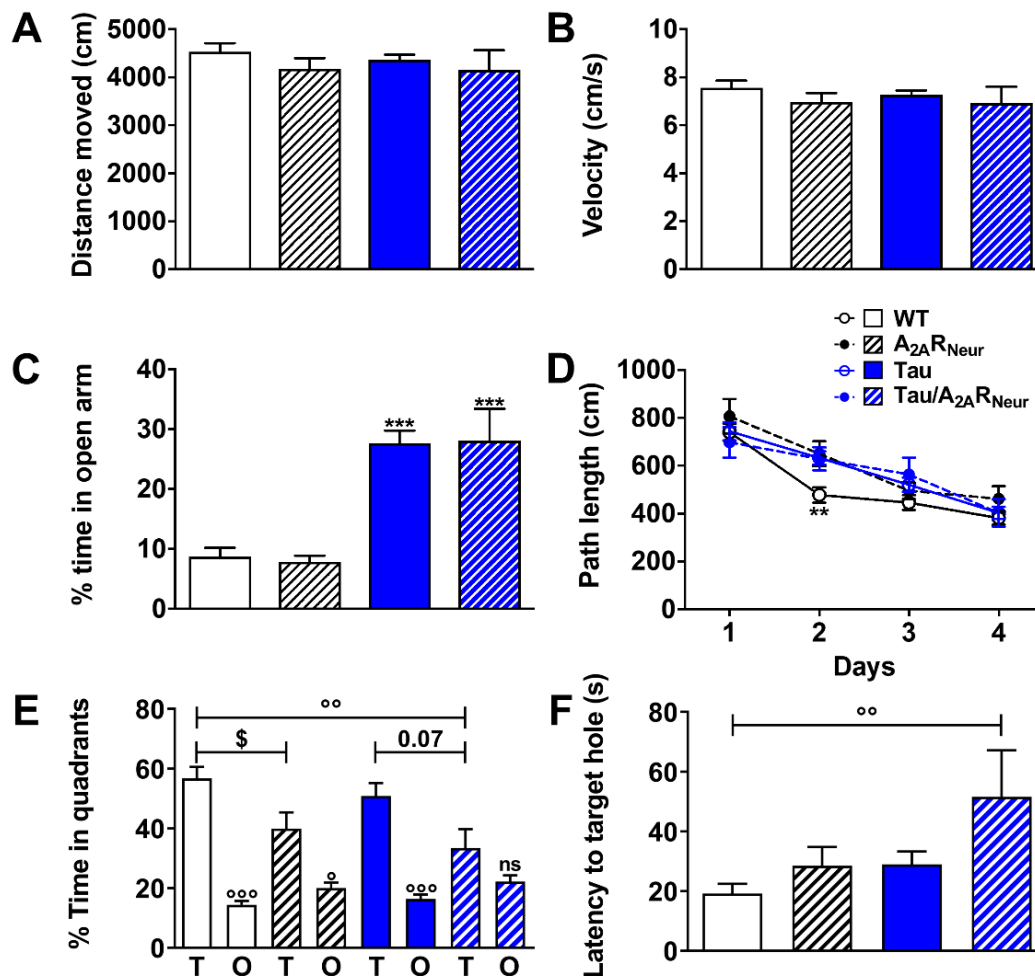


Figure 47 : La surexpression neuronale du A_{2A}R favorise les déficits de mémoire spatiale dans les souris transgénique THY-Tau22. Les effets de la surexpression neuronale du A_{2A}R ont été évalués sur l'activité spontanée, le comportement de type anxieux, l'apprentissage et la mémoire spatiale des souris THY-Tau22. (A-B) Aucun changement de l'activité locomotrice spontanée ou de vélocité n'a été observé dans le test d'actimétrie. (C) Le comportement de type anxieux a été évalué par le labyrinthe en croix surélevé. Les souris WT et A_{2A}R_{Neur} ont évité les bras ouverts, plus anxiogènes. Comme attendu, les souris tau ont passé plus de temps dans les bras ouverts que les souris WT, au même titre que les souris triple transgéniques Tau/A_{2A}R_{Neur}. ***p<0,001 vs WT en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. (D) L'évaluation de la mémoire spatiale en utilisant le labyrinthe de Barnes a révélé que tous les groupes d'animaux ont appris la position de la boîte d'échappement au cours des quatre jours d'apprentissage. (E) Durant la phase de rétention, même si elles montrent toujours une préférence, les souris A_{2A}R_{Neur} ont passé significativement moins de temps dans le quadrant cible (*target*, « T ») que les souris WT. A ce jeune âge (5-6 mois), les souris Tau ne présentent pas de trouble de mémoire, avec une forte préférence pour le quadrant cible. Néanmoins, les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} ne montrent aucune préférence pour le quadrant cible (T) par rapport aux autres quadrants (*others*, « O »), montrant une altération significative de leurs capacités mnésiques. \$p<0,05 vs WT, °p<0,05, °°p<0,01, °°°p<0,001 vs quadrant cible T en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. (F) En accord avec la perte de mémoire, la latence correspondant au temps que les souris mettent pour rejoindre le trou cible est significativement augmentée dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} par rapport aux autres groupes expérimentaux. °°p<0,01 vs WT en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 7-22 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

4. Evaluation de la pathologie tau dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}

Par ailleurs, le développement des troubles de la mémoire spatiale des souris THY-Tau22 se fait en parallèle de celui de la pathologie tau, à savoir l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine tau dans l'hippocampe (Van der Jeugd *et al.*, 2013; Burnouf *et al.*, 2013). Dans notre modèle transgénique Tau/A_{2A}R_{Neur}, les A_{2A}Rs surexprimés sont particulièrement enrichis dans les neurones de la CA1 et du gyrus denté de l'hippocampe (Figure 48), qui sont également les régions du cerveau où l'on retrouve la plus forte surexpression de la tau humaine mutée (hTau), coïncidant ainsi avec le développement progressif de la pathologie tau (Schindowski *et al.*, 2006; Van der Jeugd *et al.*, 2013). En outre, ce modèle permet de tester l'hypothèse qu'une augmentation des niveaux d'A_{2A}Rs neuronaux pourrait accélérer le développement de la pathologie tau, et expliquer la potentialisation des troubles mnésiques dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}.

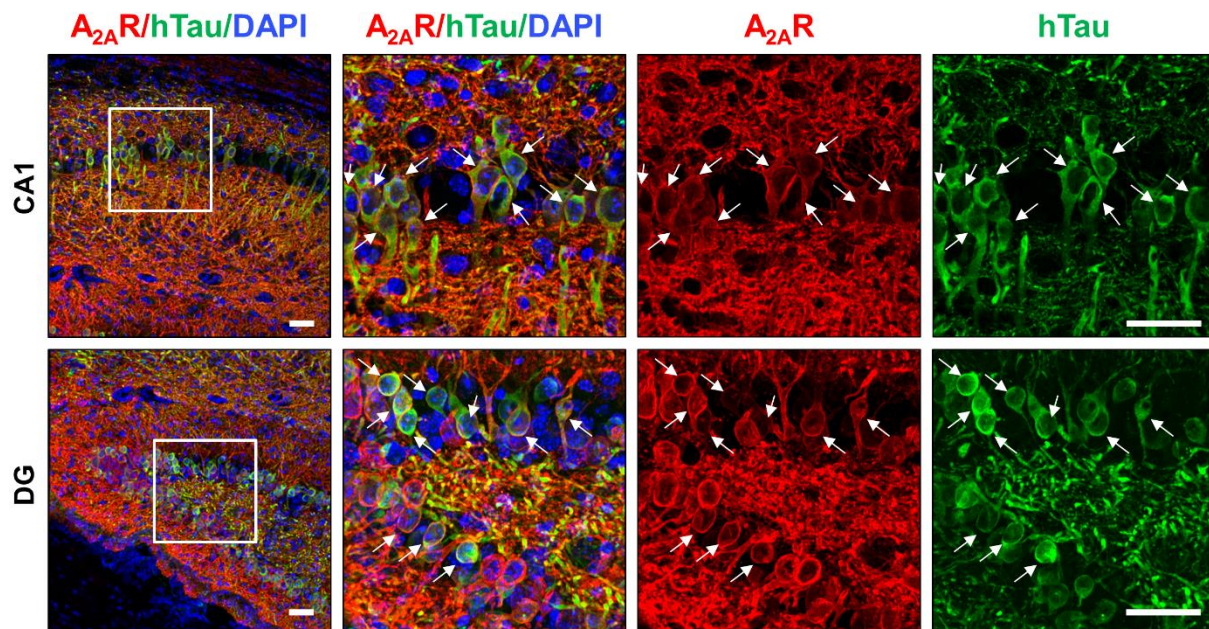


Figure 48 : Localisation cellulaire de la tau humaine et du A_{2A}R surexprimés dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}. Un co-marquage par immunofluorescence avec le A_{2A}R (rouge) et la tau humaine (anticorps TauE1E2, généré et caractérisé au sein du laboratoire, vert) dans la CA1 et le gyrus denté révèle que les neurones exprimant la tau humaine (flèche) surexpriment également le A_{2A}R. Le DAPI (bleu) marque les noyaux cellulaires. Echelle = 50µm.

Compte tenu de ce qui précède, nous avons évalué les niveaux de phosphorylations et de changements conformationnels de tau dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} par rapport aux souris Tau en utilisant des approches biochimiques et immunohistochimiques. En premier lieu, nous avons séparé les protéines selon leurs points isoélectriques et selon leurs poids moléculaires afin d'évaluer les changements globaux de phosphorylation de la protéine tau, au moyen

d'une électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons observé dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} une augmentation des espèces à pH acide par rapport aux espèces présentes dans les souris Tau, ce qui suggère une augmentation globale de phosphorylation (Figure 49A). Nous avons ensuite évalué la phosphorylation de tau par immuno-empainte en utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés de tau. En accord avec les résultats de l'analyse bidimensionnelle, nous observons une augmentation significative de la phosphorylation de tau chez les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}, en particulier une augmentation de la phosphorylation des épitopes Ser396 et Ser195/198/199/202, par rapport aux souris Tau (Figure 49B). Toutefois, nous n'avons pas observé de modification d'autres épitopes phosphorylés de tau, ni d'effet sur la protéolyse de tau (Figure 49B). Enfin, en utilisant un anticorps dirigé contre une conformation pathologique de tau (MC1), nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les groupes Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur} (Figure 49C). De surcroît, nous n'avons pas observé de différence de phosphorylation de tau chez les souris A_{2A}R_{Neur} par rapport aux souris WT (données non montrées).

Par ailleurs, afin d'expliquer l'augmentation de phosphorylation des souris Tau/A_{2A}R_{Neur} par rapport aux souris Tau, nous avons exploré la quantité relative et la phosphorylation activatrice de plusieurs kinases impliquées dans la phosphorylation des sites susnommés (Ser195/198/199/202/396) : *p38 mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK), *casein kinase 2* (CK2), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *cell division protein kinase 5* (CDK5) et son activateur neuronal p35 (Sergeant *et al.*, 2008; Hanger *et al.*, 2009). Nous avons pu observer une tendance à l'augmentation de CK2 et une augmentation significative de p35, pouvant expliquer l'augmentation de phosphorylation (Figure 50).

Dans de précédentes études réalisées au sein du laboratoire, la pathologie tau a été associée à une dégénération des neurones cholinergiques dans le septum médian, ce qui a également été lié aux déficits mnésiques (Belarbi *et al.*, 2009, 2011). Comme attendu, nous avons observé une diminution significative de la densité des neurones cholinergiques dans le septum médian des souris Tau par rapport aux souris WT. Cependant, la surexpression neuronale du A_{2A}R ne modifie pas ce phénomène (Figure 51). Ainsi, nous avons également réalisé une immuno-empainte avec l'anticorps anti-ChAT qui n'a pas mis en évidence de modification des terminaisons cholinergiques au niveau de l'hippocampe des souris Tau/A_{2A}R_{neur} par rapport aux souris Tau. Par conséquent, ces données suggèrent que la surexpression neuronale du A_{2A}R n'influence pas l'impact de tau sur les altérations cholinergiques.

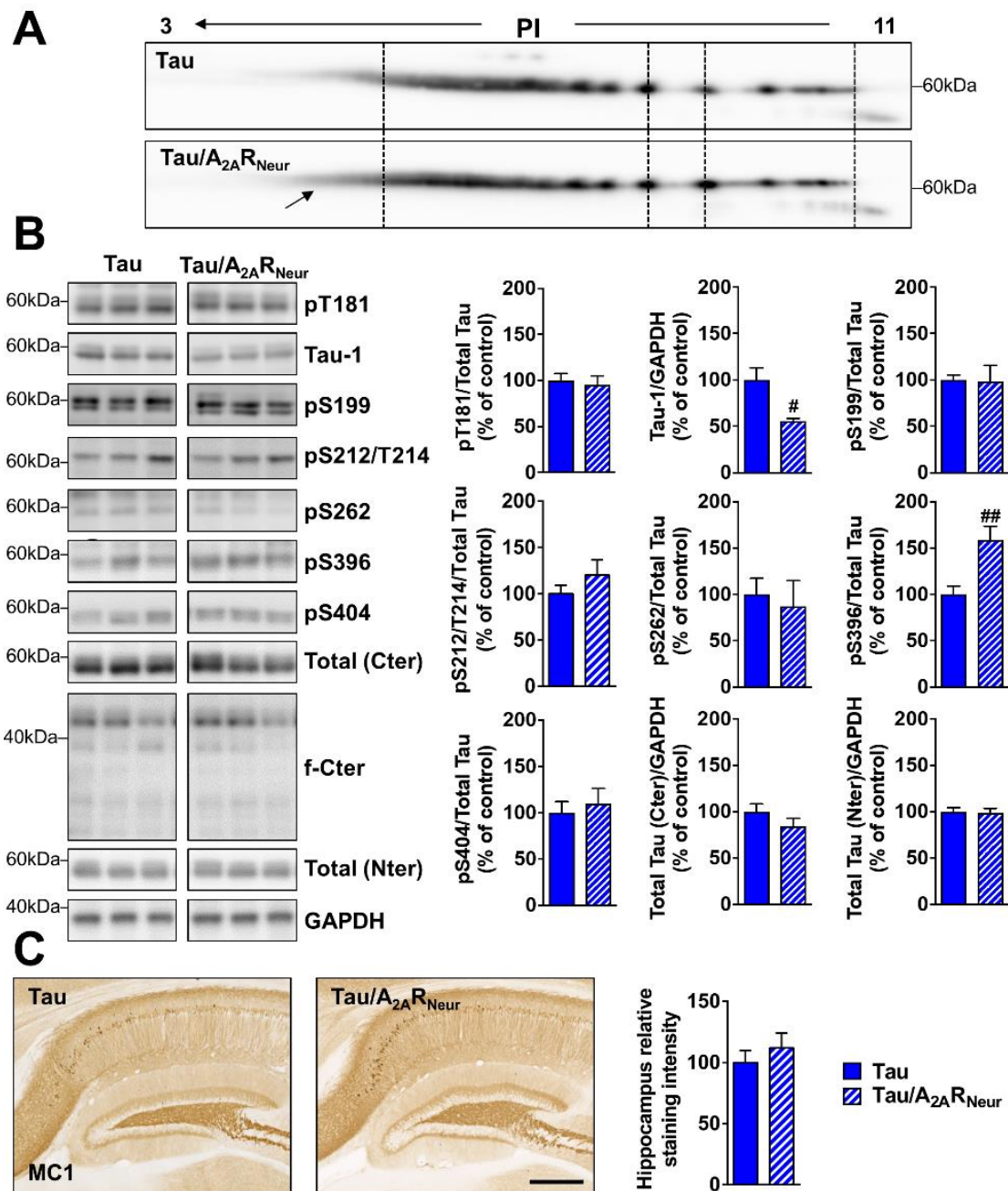


Figure 49 : Evaluation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}. La phosphorylation et l'agrégation dans l'hippocampe des souris triples transgéniques Tau/A_{2A}R_{Neur} ont été évaluées par électrophorèse bidimensionnelle, immuno-empainte et immunohistochimie. (A) Le profil électrophorétique de la protéine tau humaine total (anticorps anti-tau C-ter) révèle, dans les souris triples Tau/A_{2A}R_{Neur}, une augmentation des isovariants de tau à point isoélectrique acide (flèche) par rapport aux souris Tau. (B) Quantification de la phosphorylation de tau sur les épitopes Thr181, Ser199, Ser212/Thr214 (AT100), Ser262, Ser396 et Ser404, ainsi que l'épitope déphosphorylé (Tau-1, sites Ser195/198/199/202) dans les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur}. Les analyses révèlent une augmentation de phosphorylation sur les sites Ser396 et la région reconnue par Tau-1. [#]p<0,05 et ^{##}p<0,01 vs Tau en utilisant le test de Student. N = 6-7 par groupe. (C) Le marquage de la tau conformationnelle par l'anticorps MC1 dans les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur} n'a pas révélé de différence entre les groupes. N = 5-11 par groupe. Echelle = 500 μm. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

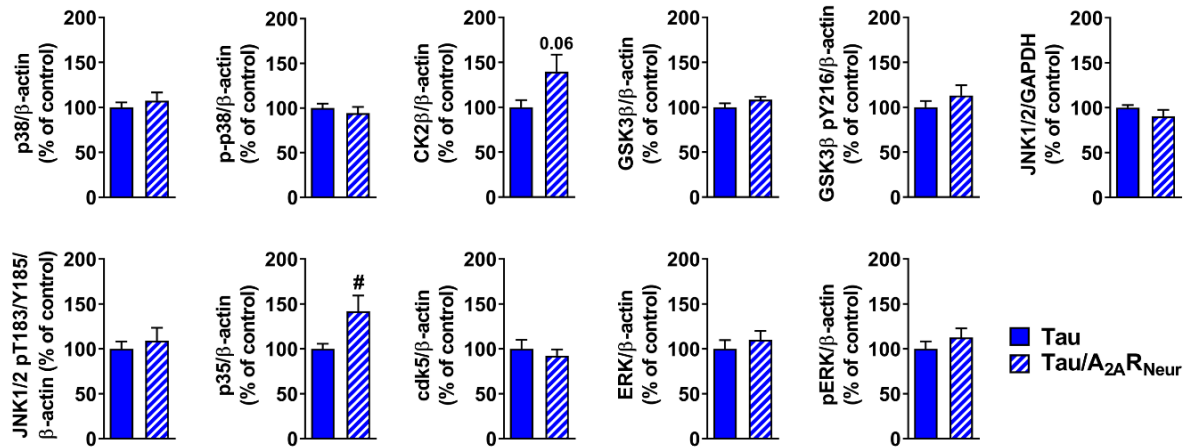


Figure 50 : Evaluation des kinases et phosphatases dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}. Quantification des changements de kinases de tau (p38, CK2, GSK3β, JNK, ERK, cdk5 et son élément de régulation p35). #p<0,05 vs Tau en utilisant le test de Student. N = 6-7 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

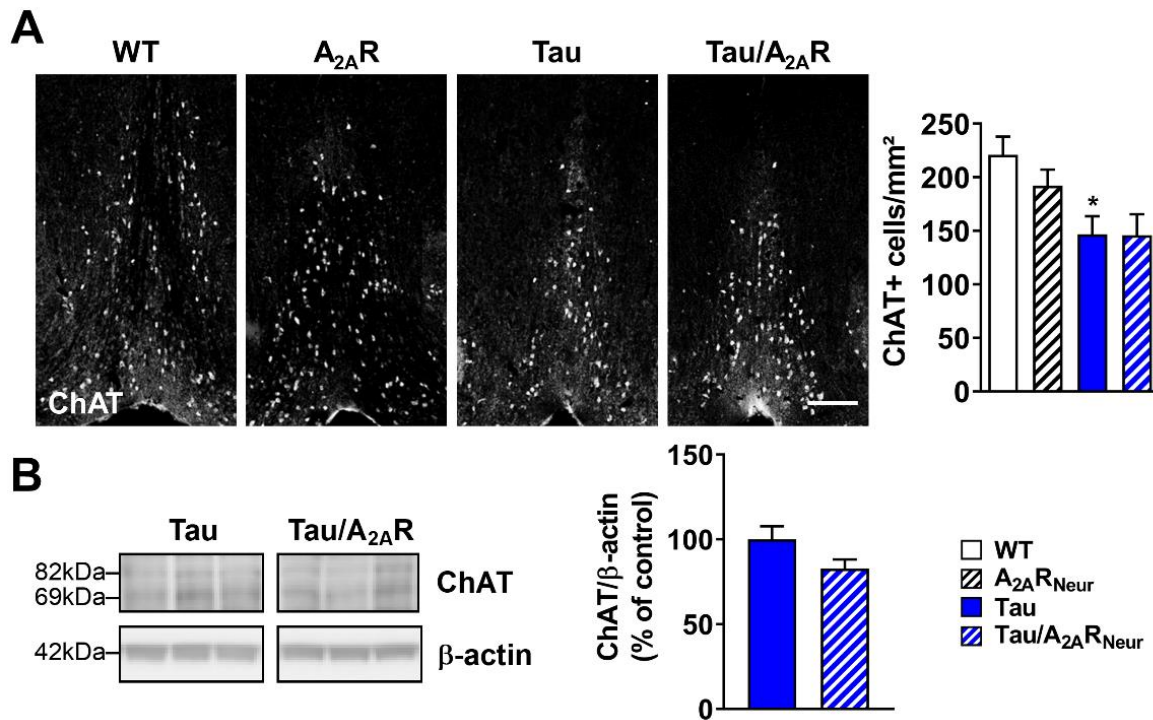


Figure 51 : Impact de la surexpression neuronale du A_{2A}R sur la dégénération des neurones cholinergiques du septum médian. (A) L'immunomarquage de l'acétylcholine transférase (ChAT) a révélé, comme attendu, une diminution significative de la densité de neurones cholinergiques dans le septum médian des souris Tau par rapport aux souris WT. La perte de neurones cholinergiques a été retrouvée de façon similaire dans les souris triples Tau/A_{2A}R_{Neur}. *p<0,05 vs WT en utilisant un test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 5-11 par groupe. Echelle = 500 μm. (B) Expression de ChAT dans l'hippocampe. A noter la présence de deux bandes immunoréactives comme précédemment rapportées (Misawa *et al.*, 1997). N = 6-7 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

5. Evaluation transcriptionnelle des souris Tau/A_{2A}R_{Neur}

En vue de mieux comprendre les conséquences de la surexpression neuronale du A_{2A}R dans les contextes WT et Tau, nous avons réalisé un séquençage de l'ARNm à partir des hippocampes des souris des différents groupes expérimentaux. Conformément à une précédente étude (Chatterjee *et al.*, 2018), un nombre limité de gènes sont exprimés différemment entre les souris THY-Tau22 par rapport aux souris WT (Figure 52A et B). La surexpression neuronale du A_{2A}R n'a en elle-même pas induit de changement transcriptomique (Figure 52A). Par contraste, en comparant les souris Tau/A_{2A}R_{neur} par rapport aux souris Tau nous avons trouvé 505 gènes différentiellement et significativement exprimés ($\text{Log}_2\text{FoldChange} > 0,32$, $\text{adjusted } p\text{-value} < 0,05$), avec 64 gènes surexprimés et 441 gènes sous-exprimés ((Figure 52B).

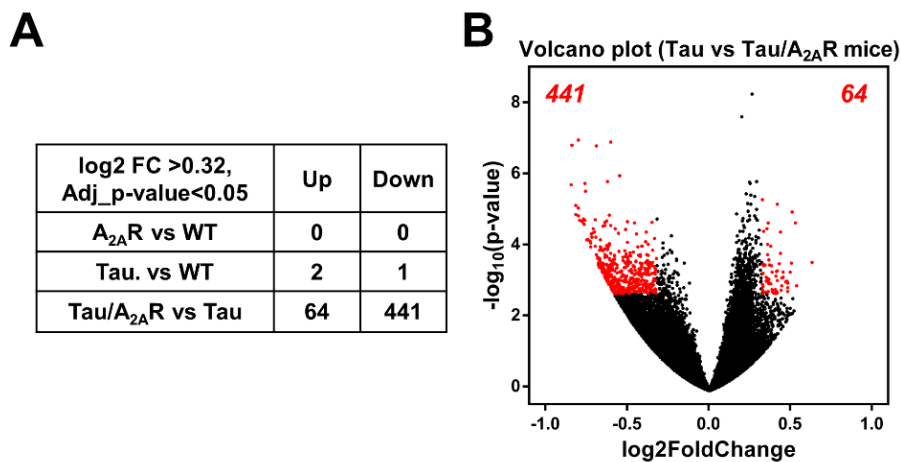


Figure 52 : Séquençage de l'ARNm chez les souris WT, A_{2A}R_{Neur}, Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur} à l'âge de 6 mois. (A) Alors que, à cet âge, les changements transcriptomiques globaux observés dans les souris Tau et double A_{2A}R_{Neur} sont très marginaux comparés avec les souris WT, nous avons observé une dysrégulation importante de 505 gènes entre les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur}. (B) Le volcano plot montre les 505 gènes dérégulés significativement ($\text{adjusted } p\text{-value} < 0,05$ et $\text{Log}_2\text{FoldChange} > 0,32$, en rouge) entre les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Neur}. Parmi les 505 gènes, 64 sont retrouvés surexprimés et 441 sous-exprimés dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} par rapport aux souris Tau. N=4 par génotype.

L'analyse *in silico* a permis d'identifier les voies moléculaires dans lesquelles les gènes sous-exprimés sont impliqués (*Functional Biological Process*): ils sont associés au métabolisme des ARN, avec une significativité modérée, témoin d'un enrichissement faible comme nous l'avons montré sur la base de données d'associations fonctionnelles des protéines STRING (Figure 53A et B). Inversement, les gènes surexprimés sont associés aux processus du système immunitaire, à la réponse immunitaire innée et à la phagocytose (Figure 53C). En utilisant la base de données STRING, nous avons observé une interaction forte entre 24 des 64 gènes surexprimés, associés au système immunitaire (Figure 53D).

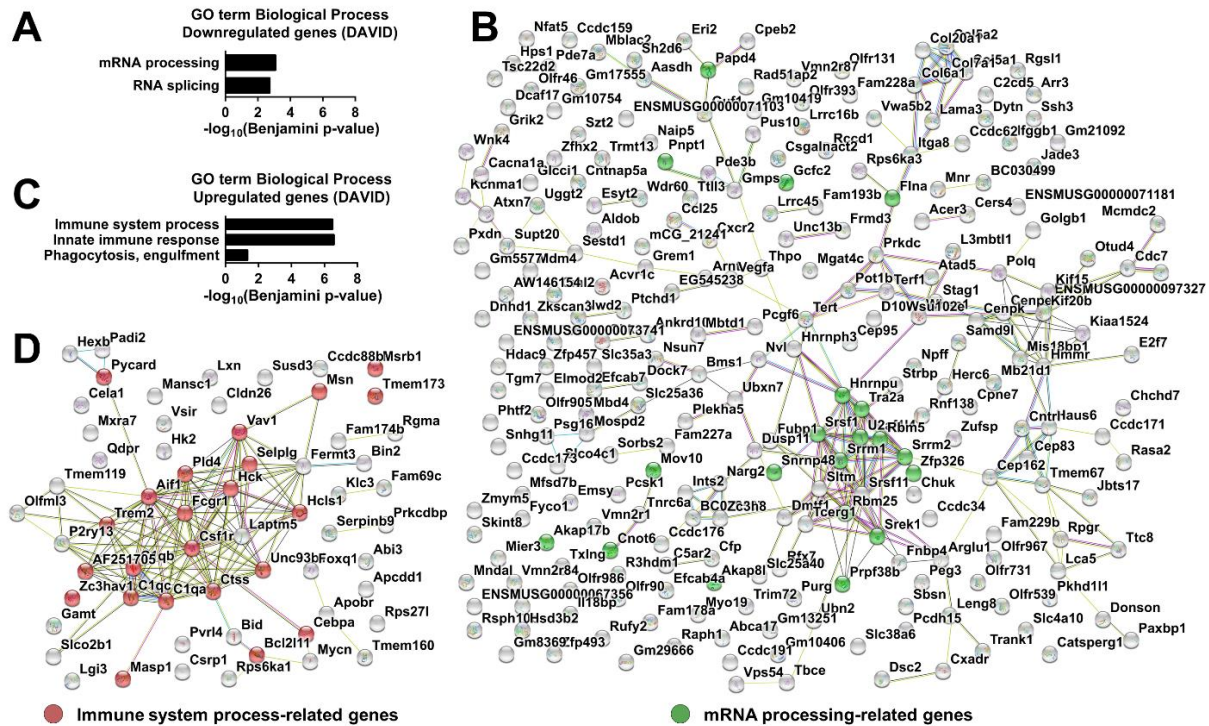


Figure 53 : Annotation fonctionnelle (GO term) et analyse des regroupements de gènes (cluster). L’annotation fonctionnelle des 64 gènes surexprimés et des 441 gènes sous-exprimés dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} vs Tau a été réalisé sur le logiciel DAVID pour les GOTERM_Biological Process. L’analyse révèle une association significative des gènes sous-exprimés avec le métabolisme des ARNm (A) alors que les gènes surexprimés sont associés aux processus du système immunitaire, à la réponse immunitaire innée et à la phagocytose (C). Il est à noter que l’enrichissement des gènes de la fonction immunitaire ont une significativité bien plus haute que ceux lié au métabolisme des ARNs (*Benjamini p-value*). Les interactions protéiques connues et putatives des gènes ont été analysés par la base de données en ligne STRING pour les 64 gènes surexprimés (D) et pour les 441 gènes sous-exprimés (B) dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur}. Cette première analyse montre un regroupement de gènes important lié à l’immunité dans les gènes surexprimés (D, en rouge), alors que parmi les gènes sous-exprimés peu sont associés au métabolisme des ARNm (B, en vert).

Dans le but de déterminer dans quelle(s) population(s) cellulaire(s) ces gènes sont enrichies, nous avons utilisé une base de donnée issue du séquençage de l’ARN de populations triées du système nerveux central, du laboratoire de Ben Barres (Zhang *et al.* 2014 ; http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html). A cet égard, alors que la surexpression du A_{2A}R est induite spécifiquement dans les neurones de l’hippocampe des souris Tau/A_{2A}R_{Neur}, nous n’avons trouvé que très peu de gènes enrichis dans les neurones. A l’inverse, et en accord avec l’association des gènes aux processus immunitaires, 33 des 54 gènes (~61%) sont retrouvés enrichis dans les cellules microgliales (Figure 54A). Parmi ces gènes nous avons retrouvé Csf1r, Trem2 et C1qa, qui ont été validé par des expériences de PCR quantitative (qPCR) avec d’avantage d’échantillons (Figure 54B). De récentes études

basées sur un séquençage de l'ARNm de cellules microgliales ont démontré que celles-ci présentent un transcriptome différents dans le cadre des maladies neurodégénératives par rapport à leur activation classique durant une infection (Butovsky & Weiner, 2018). Ainsi, nous avons comparé les 33 gènes surexprimés et enrichis dans les cellules microgliales des souris Tau/A_{2A}R_{neur} avec le profil transcriptomique de cellules microgliales issu d'études sur les maladies neurodégénératives. Nous n'avons trouvé que très peu de gènes communs (Holtman *et al.*, 2015; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Mathys *et al.*, 2017), possiblement due à des différences expérimentales (tissu entier dans notre cas par rapport à une analyse sur des cellules microgliales triées). En revanche, nous avons trouvé beaucoup de gènes communs entre les gènes surexprimés dans les souris Tau/A_{2A}R_{neur} et les souris PS2APP, un modèle d'amyloïdogénèse (26 gènes communs) et les souris SOD1, un modèle de sclérose latérale amyotrophique (25 gènes communs), tout deux dérivés d'analyses en tissu entier (cortex ou moelle épinière) (Srinivasan *et al.*, 2016), ce qui suggère que les souris Tau/A_{2A}R_{neur} ont un profil d'expression associé à la neurodégénérescence. En outre, il est intéressant de constater que les marqueurs inflammatoires classiquement augmentés dans les souris Tau à cet âge ne sont pas modifiés par la surexpression neuronale du A_{2A}R (Figure 55), suggérant une voie inflammatoire alternative en œuvre chez les souris Tau/A_{2A}R_{neur}.

6. Evaluation microgliale dans l'hippocampe des souris Tau/A_{2A}R_{neur}

Classiquement, lorsque leurs transcriptomes sont modifiés, les cellules microgliales augmentent typiquement en nombre et changent considérablement de morphologie durant le vieillissement et les maladies neurodégénératives (Baron *et al.*, 2014), traduisant des changements fonctionnels, notamment en termes de phagocytose et de libération de molécules inflammatoires. Toutefois, dans les stades précoces d'amyloïdogénèse cérébrale, malgré une augmentation de la phagocytose microgliale du matériel synaptique, peu d'altérations morphologiques sont visibles (Hong *et al.*, 2016), ce qui suggère que les altérations morphologiques ne sont pas un pré-requis pour les changements fonctionnels microgliaux. Afin de caractériser le nombre de cellules et les changements morphologiques dans notre modèle, nous avons analysé un marquage fluorescent avec un anticorps anti-Iba1 dans les régions CA1 et gyrus denté. A cette fin, nous avons utilisé un plugin ImageJ personnalisé, qui permet la quantification automatique du soma cellulaire dans un tissu en trois dimensions (3D), de reconstruire les cellules en 3D et d'analyser leurs squelettes cellulaires de façon individuel (Figure 54C) (Plescher *et al.*, 2018). Globalement, les paramètres morphologiques

microgliaux, à savoir l'index de ramification (une mesure de la complexité cellulaire), le volume occupé (une mesure du volume de tissu surveillé par une cellule microgliale) et la longueur de l'arbre dendritique total (une mesure de la complexité du squelette cellulaire) ne sont pas significativement modifiés dans la région CA1 (Figure 54D) ni dans le gyrus denté (Figure 54E) entre les différents groupes.

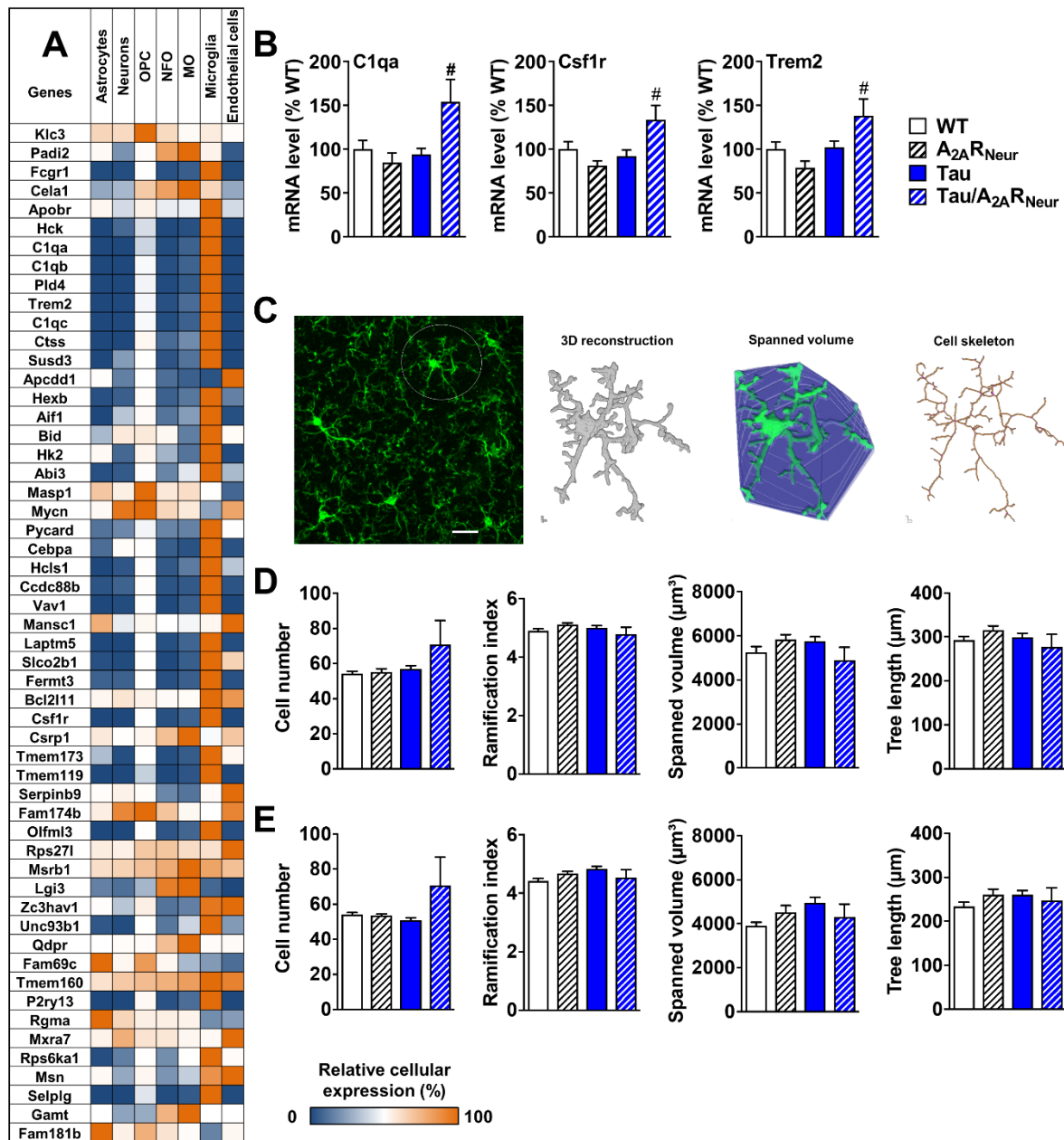


Figure 54 : La surexpression neuronale des A_{2A}Rs favorise l'activation d'une signature transcriptomique microgliale particulière dans l'hippocampe des souris Tau. (A) Carte de chaleur (*heatmap*) représentant l'enrichissement cellulaire relatif de chaque gènes surexprimés dans une base de données transcriptomiques issue de populations purifiées de neurones, astrocytes, cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC), d'oligodendrocytes nouvellement formées (NFO), d'oligodendrocytes myélinisant (MO), de microglies et de cellules endothéliales (Zhang *et al.*, 2014).

L'enrichissement cellulaire relatif de chaque gènes est donné en pourcentage de l'expression la plus haute. Parmi les gènes surexprimés, 33 sont particulièrement enrichis dans les cellules microgliales, ce qui contraste avec le manque d'enrichissement neuronal. **(B)** Validation de gènes surexprimés dans le séquençage de l'ARNm : C1qa, Csf1r et Trem2 par PCR quantitative sur un autre lot d'animaux. # $p < 0,05$ vs Tau en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 6–14 par groupe. **(F)** Le nombre de cellules et la morphologie des cellules gliales ont été analysés par immunofluorescence (anticorps anti-Iba1), photographiés sur un microscope confocal puis quantifiés avec un plugin ImageJ personnalisé. Une image représentative du marquage, de la reconstruction 3D, de la visualisation du volume surveillé par chaque cellule microgliale et du squelette cellulaire dérivé d'une cellule représentative dans une image confocale sont montrées. Echelle = 20 μm . **(C-E)** La quantification du nombre de cellules microgliales et les paramètres morphologiques n'a pas révélé de différence significative entre les groupes de souris dans la CA1 **(D)** ni dans le gyrus denté **(E)**. N = 5-6 souris par génotype. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

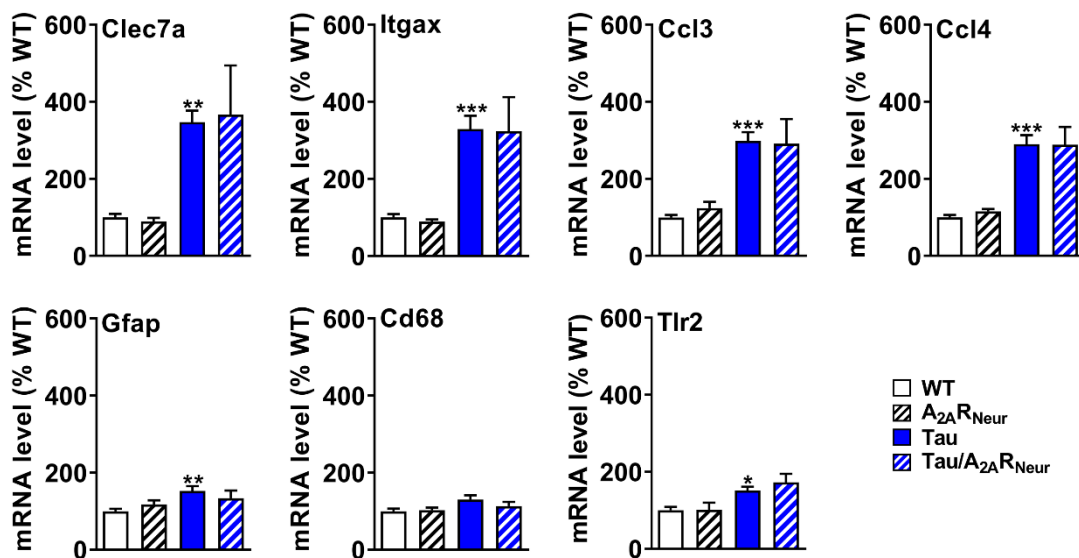


Figure 55 : Neuroinflammation classique des souris Tau. Evaluation de marqueurs inflammatoires classiquement retrouvés augmentés dans les souris THY-Tau22 (Laurent *et al.*, 2017) par PCR quantitative. N = 6–14 par groupe. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs WT en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

7. Evaluation de C1q et de l'intégrité synaptique des souris Tau/A_{2A}R_{Neur}

De précédents travaux ont souligné l'implication de la protéine C1q dans les troubles cognitifs liés à l'âge ainsi que la perte synaptique dans la maladie d'Alzheimer et les tauopathies (Stephan *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2016; Dejanovic *et al.*, 2018). Par ailleurs, nous avons évalué l'expression génique de C1q et Trem2 dans les souris THY-Tau22 à différents âges (3, 6 et 9 mois) et nous avons retrouvé une augmentation de C1q aux alentours de 9 mois, dans l'hippocampe (Figure 56A), à un âge où ces souris montrent des altérations mnésiques majeures (Van der Jeugd *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2016, 2017), associés à une perte de densité des épines dendritiques (Burlot *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2018). De

surcroît, nous avons également montré que lors du blocage du A_{2A}R par un antagoniste sélectif, le MSX-3, qui diminue la pathologie tau et prévient les déficits mnésiques chez la souris THY-Tau22 âgée de 9 mois (Laurent *et al.*, 2016), les niveaux de C1q et Trem2 sont retrouvés à un niveau basal (Figure 56B ; Laurent *et al.*, 2016). Aussi, C1q est retrouvé significativement augmenté dans les souris Tau/A_{2A}R_{Neur} à l'âge de 6 mois par rapport aux souris Tau (Figure 57A), avec une augmentation particulièrement notable dans la couche moléculaire du gyrus denté (flèche, Figure 57B et C), contrairement aux autres groupes – WT, A_{2A}R_{Neur} et Tau – chez lesquels C1q est inchangé. Par conséquent, ces observations suggèrent fortement que la surexpression neuronale du A_{2A}R dans les souris THY-Tau22 conduit à un phénotype anticipé.

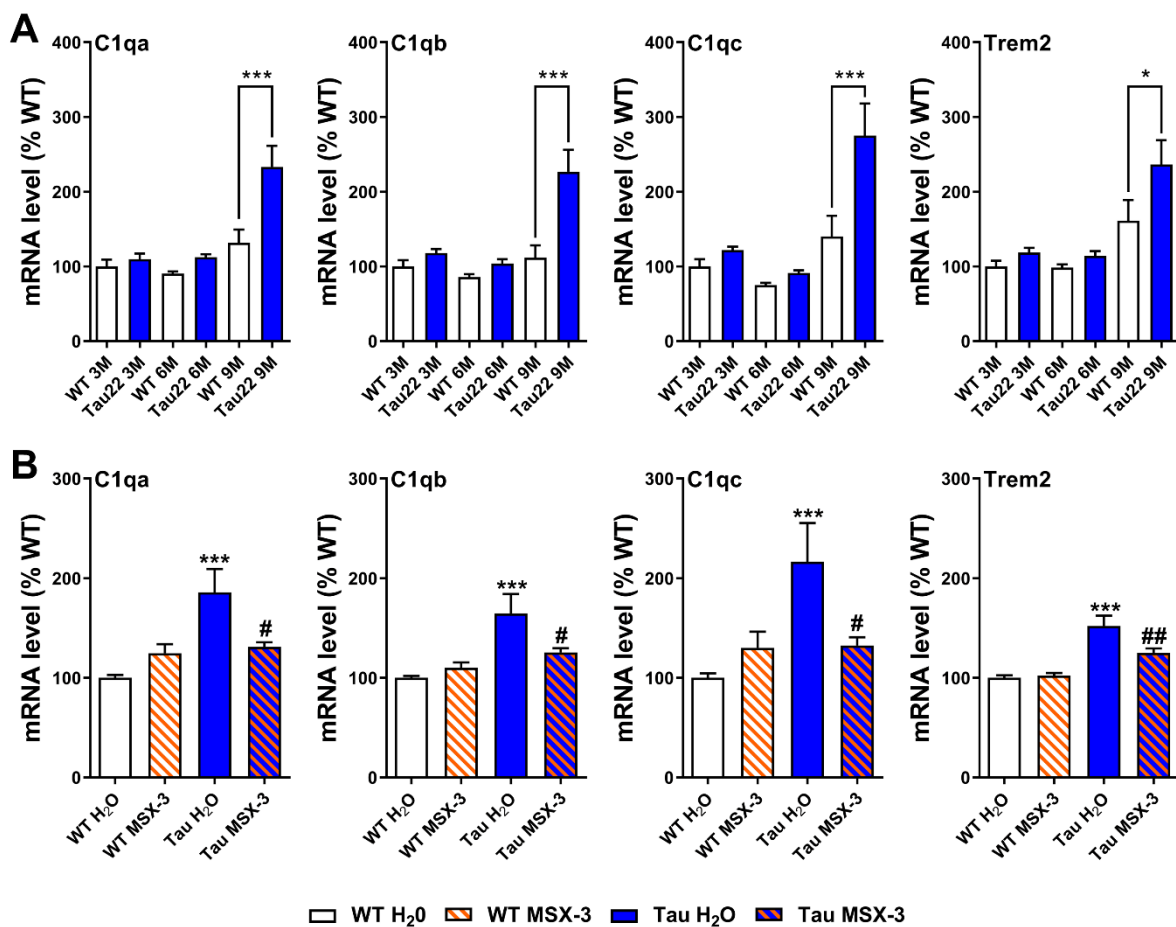


Figure 56 : Les 3 sous-unités de C1q ainsi que Trem2 sont augmentés chez les souris THY-Tau22 à partir de 9 mois et cet effet est aboli lorsque le A_{2A}R est bloqué. (A) Expression génique par qPCR des trois sous-unités fonctionnelles de l'hétérotrimère de la protéine du complément C1qa, C1qb, C1qc et Trem2 dans les souris WT et Tau à 3, 6 et 9 mois. N=4-10 par groupe. *p<0,05, ***p<0,001 vs WT 9 mois en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. **(B)** Effets du blocage du A_{2A}R par un antagoniste sélectif, le MSX-3, chez des souris WT et Tau à 9 mois sur l'expression des mêmes marqueurs. N = 4-8 par groupe. ***p<0,001, vs WT H₂O, #p<0,05, ##p<0,01 vs Tau H₂O en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

Ainsi, l'augmentation de C1q a été précédemment associée à une perte synaptique dans un contexte de pathologie tau et de pathologie amyloïde (Hong *et al.*, 2016; Dejanovic *et al.*, 2018). En accord avec l'augmentation particulière de C1q dans le gyrus denté, nous avons trouvé une atrophie significative dans cette région de l'hippocampe dans les souris Tau/A_{2A}R_{neur} (Figure 57D).

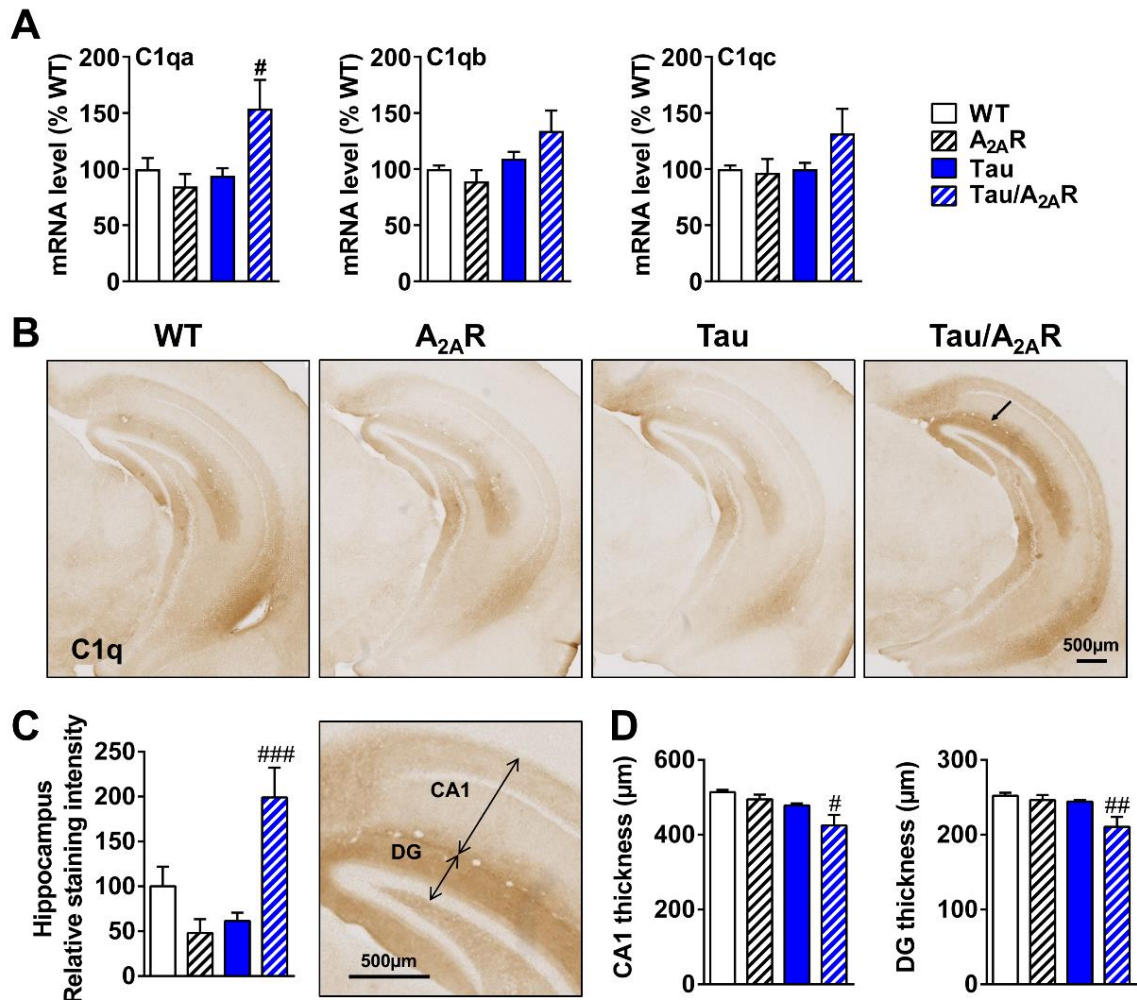


Figure 57 : La surexpression neuronale du A_{2A}R dans les souris Tau est associée à une augmentation de C1q et à une atrophie de l'hippocampe. (A) L'augmentation de l'expression de C1q a été confirmée par PCR quantitative. [#]p<0,05 vs Tau en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 6-14 par groupe. (B) Images représentatives d'un marquage anti-C1q dans les quatre groupes expérimentaux par immunohistochimie. (C) La quantification du marquage a confirmé une augmentation de C1q au niveau de l'hippocampe des souris Tau/A_{2A}R_{neur} mais pas dans les trois autres groupes. ^{###}p<0,001 vs Tau en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 3-11 par groupe. (D) Des analyses morphométriques réalisées sur ces coupes ont révélé une atrophie de la CA1 et du gyrus denté chez les souris Tau/A_{2A}R_{neur}. [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 vs Tau en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N = 5-11 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem. Echelles = 500 μm.

Afin d'expliquer cette atrophie hippocampique, nous avons évalué par immunofluorescence la densité synaptique dans le gyrus denté, qui est la zone de l'hippocampe où le C1q est le plus accumulé. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre des marqueurs présynaptiques de synapses inhibitrices (VGAT) et excitatrices (VGLUT1) (Figure 58A). Ainsi, nous avons trouvé une diminution de la densité de synapses glutamatergiques, marquées par VGLUT1, dans la couche moléculaire (Figure 58B) des souris Tau/A_{2A}R_{Neur}. Le nombre de synapses immunoréactives pour VGAT n'est cependant pas affecté (Figure 58C), suggérant une perte synaptique restreinte aux neurones glutamatergiques des souris Tau/A_{2A}R_{Neur}. Enfin, aucune perte de densité n'a été observée dans le hile (Figure 58D). En définitive, ces données suggèrent que la surexpression neuronale du A_{2A}R dans les souris THY-Tau22 conduit à une augmentation de C1q associée à une perte de synapses glutamatergiques dans le gyrus denté.

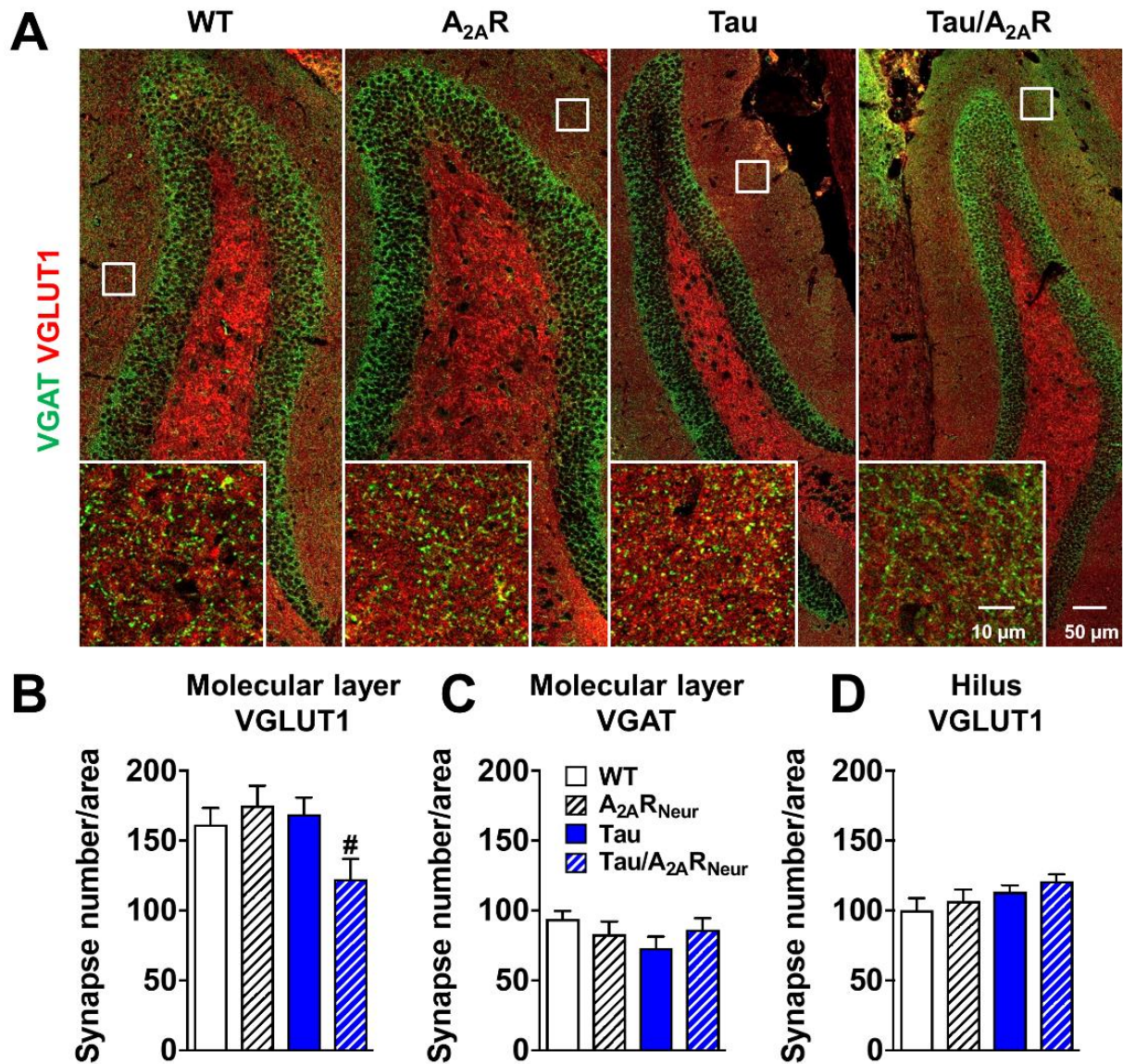


Figure 58 : La surexpression neuronale du A_{2A}R dans les souris Tau est associée à une perte synaptique. (A) Immunofluorescence pour un marqueur présynaptique excitateur (VGLUT1, en rouge) et inhibiteur (VGAT, en vert). Echelle = 50 μm à faible grossissement et 10 μm à fort grossissement. (B) Une diminution significative de la densité des synapses excitatrices VGLUT1⁺ a été observée dans la couche moléculaire du gyrus denté, mais pas dans le hile du gyrus denté (D). Aucune différence n'a été observée au niveau de la densité de synapses inhibitrices VGAT⁺ (C). #p<0,05 vs Tau en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-hoc* HSD de Tukey. N=14-16 images issues de 4 souris par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

8. Expression de C1q et A_{2A}R dans trois tauopathies primaires

Afin d'établir un lien entre la pathologie tau, la surexpression du A_{2A}R et C1q, nous avons voulu vérifier dans plusieurs tauopathies si nous étions en mesure de voir une augmentation commune du A_{2A}R et de C1q. A cette fin, nous avons utilisé trois dégénérescences lobaires fronto-temporales : une forme génétique FTLD-tau *MAPT* P301L (cf. Figure 43, page 132) et deux formes sporadiques : la maladie de Pick (« Pick ») et la dégénérescence cortico-basale (CBD). Dans le cerveau des patients atteints de FTLD-tau *MAPT* P301L, où nous avons mis en évidence une augmentation neuronale du A_{2A}R, nous retrouvons également une accumulation de protéines C1q (Figure 59). De la même façon que chez les souris, nous avons aussi été en mesure d'observer une augmentation d'expression de A_{2A}R et de C1q dans le cortex frontal des patients atteints de dégénérescence cortico-basale (Figure 60A) et de la maladie de Pick (Figure 60B) par rapport aux sujets âgés contrôles. Nous retrouvons également des variations d'expression de Trem2 dans le même sens que le A_{2A}R et C1q dans ces deux maladies (Figure 60A et B). Dès lors, l'ensemble de ces données renforce le rôle instrumental de la dysrégulation neuronale du A_{2A}R comme promoteur d'une réponse microgliale spécifique du C1q dans un contexte pathologique.

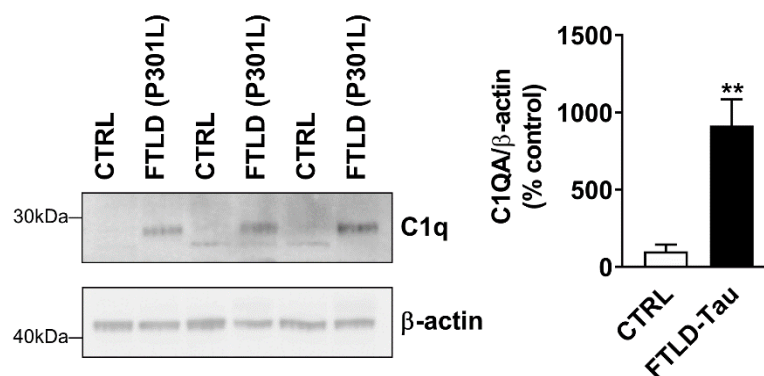


Figure 59 : Augmentation de C1q dans le cortex temporal des patients avec une dégénérescence lobaire fronto-temporale avec mutation *MAPT* P301L (FTLD-tau). L'analyse par immunoempreinte dans le cortex des patients FTLD-tau et des sujets âgés contrôles (CTRL) de la Figure 43 révèle une augmentation significative de C1q chez les patients FTLD-tau. ** $p < 0,01$ vs CTRL en utilisant le test de Student. N = 3 par groupe.

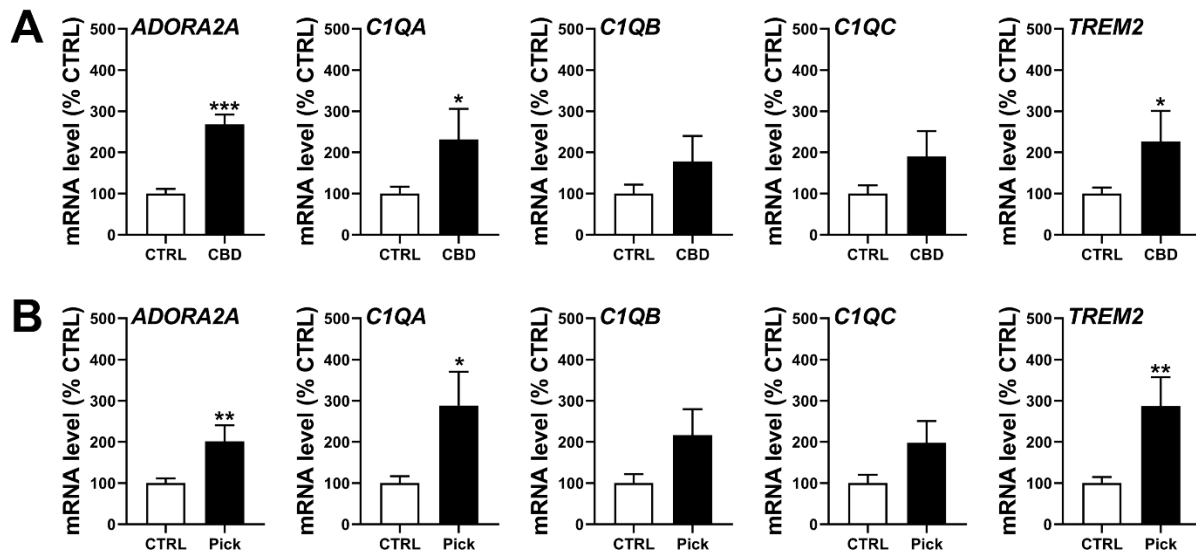


Figure 60 : Augmentation de l'expression de *ADORA2A*, *C1Q* et *TREM2* dans le cortex frontal de deux tauopathies primaires sporadiques : la démence corticobasale (CBD) et la maladie de Pick (« Pick »). Evaluation par PCR quantitative de l'expression de *ADORA2A*, *C1QA*, *C1QB* et *C1QC* et *TREM2* chez les patients atteints de la démence corticobasale (A) et de la maladie de Pick (B). N=5-9 par groupe. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs CTRL en utilisant le test de Student. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

9. Conclusion

En somme, cette étude a permis de démontrer que le A_{2A}R était augmenté dans les tauopathies, en particulier au niveau des neurones présentant une pathologie tau. Par ailleurs, cette augmentation du A_{2A}R dans ce contexte jouerait un rôle dans le développement de la pathologie tau et des troubles cognitifs associés, via une réponse microgliale dépendante du C1q. Ce dernier, dans un tel contexte, contribuerait à induire une perte synaptique et provoquer les déficits mnésiques. Dans cette optique, de nombreux travaux ont démontré que la pathologie tau ou amyloïde induisait une perte synaptique. Assurément, la pathologie amyloïde est suffisante pour augmenter le A_{2A}R au niveau synaptique (Viana da Silva *et al.*, 2016), mais également de favoriser l'augmentation du C1q (Hong *et al.*, 2016). Pour celà, afin de déterminer si l'augmentation du A_{2A}R dans un contexte de pathologie amyloïde induit également une augmentation de la réponse microgliale spécifique de C1q, nous avons induit une surexpression neuronale du A_{2A}R dans un modèle de pathologie amyloïde.

Partie II : Surexpression neuronale du récepteur A_{2A} dans un modèle d'amyloïdogénèse

1. Caractérisation de l'expression du A_{2A}R par approche AAV

Dans le but d'évaluer l'impact d'une augmentation neuronale du A_{2A}R sur le développement de la pathologie amyloïde et des troubles cognitifs associés, j'ai pu au cours de ma thèse participer à la caractérisation de ce modèle. Cette surexpression du A_{2A}R a été induite par un virus AAV2/5, exprimant la protéine transactivatrice tTA sous promoteur chicken β -actin (CBA) (AAV2/5-CBA-tTA) (Figure 61A). Ce virus AAV a ensuite été injecté de façon bilatérale dans l'hippocampe des souris TRE-A_{2A}R afin de permettre, via la protéine tTA, l'expression du A_{2A}R dans les neurones hippocampiques (Figure 61A et B). La caractérisation de ce virus montre une haute sélectivité de l'AAV pour les neurones. Trois mois après injection, l'expression du A_{2A}R est relativement forte dans l'hippocampe (Figure 61C) et spécifiquement retrouvés dans les neurones (Figure 61D).

Afin de générer les animaux d'intérêts, nous avons utilisés les souris APP^{sw}/PS1^{dE9}, un modèle d'amyloïdogénèse, développant progressivement une pathologie amyloïde corticale et hippocampique associée à l'apparition de troubles cognitifs et une neuroinflammation (Jankowsky *et al.*, 2001, 2004; Faivre *et al.*, 2018). Nous avons croisé ces souris APP^{sw}/PS1^{dE9} (« APP/PS1 ») avec les souris TRE/A_{2A}R afin d'obtenir des animaux doubles transgéniques APP^{sw}/PS1^{dE9}/TRE-A_{2A}R (« APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} ») et leurs contrôles de portées WT, TRE-A_{2A}R et APP/PS1.

Les souris APP/PS1/TRE-A_{2A}R ont été injectées à l'âge de 3 mois puis évaluées en comportement à l'âge de 5-6 mois puis analysées à 6 mois. Les analyses suivantes ont été faites chez les femelles uniquement, qui présentent une pathologie amyloïde plus précoce que les mâles (Wang *et al.*, 2003; Jiao *et al.*, 2016b). Dans ce même modèle APP/PS1, il a été montré que dès 6 mois, il y a une augmentation synaptique du A_{2A}R (Viana da Silva *et al.*, 2016). Nous avons donc décidé d'induire cette surexpression à un âge plus précoce, 3 mois, afin de voir si cela a une conséquence sur l'évolution de la pathologie amyloïde et sur les déficits cognitifs.

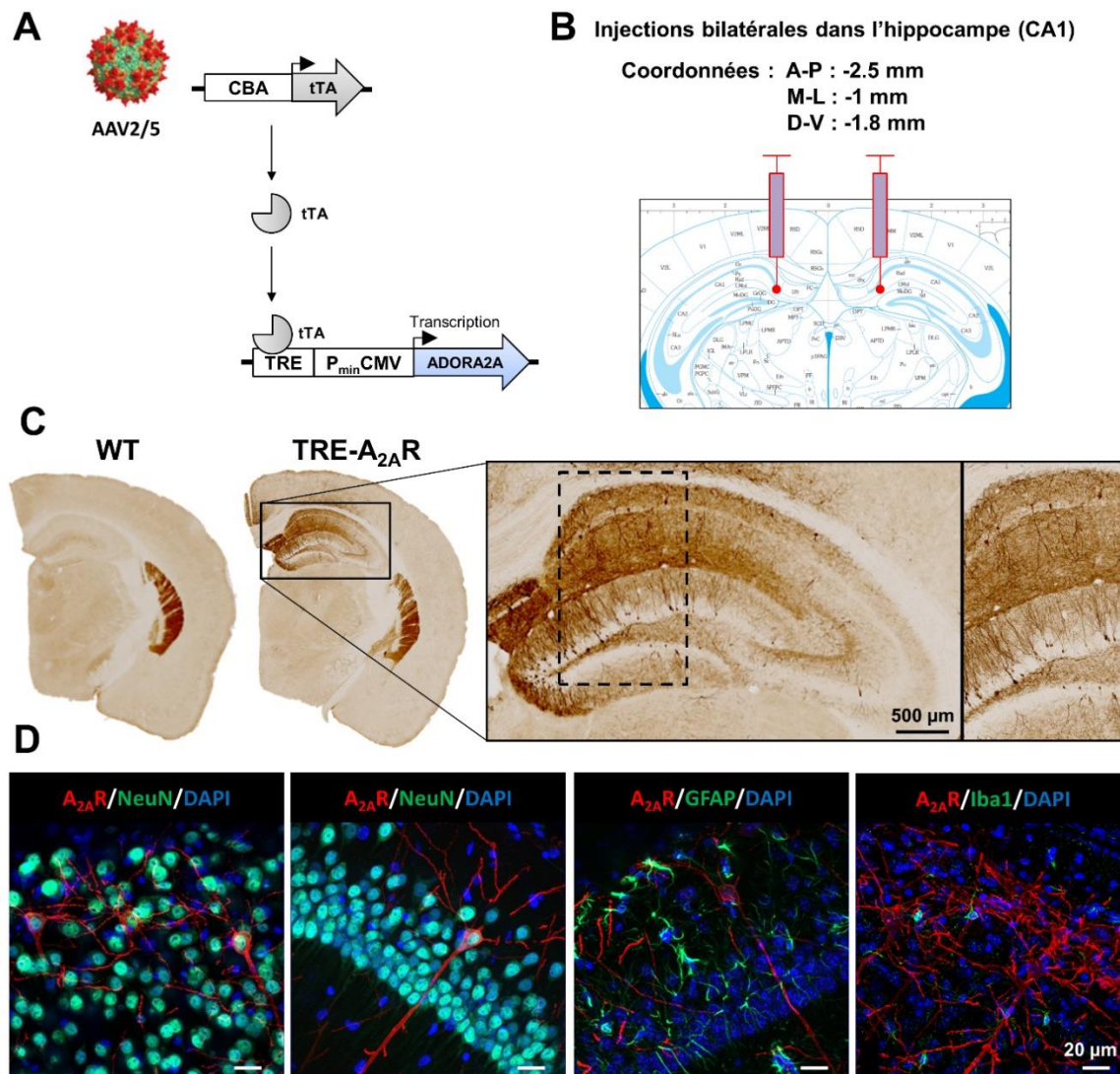


Figure 61 : Caractérisation de la surexpression du A_{2A}R induite par un virus adéno-associé (AAV). (A) La surexpression du A_{2A}R dans les neurones a été obtenue par l'injection d'un virus adéno-associé avec le génome du sérotype 2 et de capside 5 (AAV2/5) permettant l'expression de la protéine transactivatrice tTA sous promoteur chicken β-actin (CBA) (AAV2/5-CBA-tTA-WPRE-bGH). Le couplage entre l'AAV 2/5 et le promoteur CBA permet une expression du tTA spécifiquement dans les neurones. La protéine tTA peut ensuite rejoindre son élément de réponse à la tétracycline (TRE) et permettre l'expression du A_{2A}R dans les neurones (cf. Figure 44 p134). (B) L'AAV est injecté de façon bilatérale par stéréotaxie sur animal anesthésié par kétamine et xylazine dans l'hippocampe, aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : antéro-postérieur -2,5 mm ; médio-latéral : -1 mm ; dorso-ventral : -1,8 mm. Dans chaque hippocampe, 2 μl ont été injectés à une concentration de 5.10⁷vg/μl. (C) L'injection d'AAV2/5-CBA-tTA n'induit pas de surexpression du A_{2A}R chez la souris WT. Cependant, injecté chez la souris TRE-A_{2A}R, l'AAV induit une forte expression du A_{2A}R dans les neurones de l'hippocampe, avec une diffusion limitée dans le cortex adjacent. Echelle = 500μm. (D) Différents co-marquages ont été réalisés par immunofluorescence avec un marquage du A_{2A}R (rouge) et un marquage neuronal (NeuN, vert), astrocytaire (GFAP, vert) ou microglial (Iba1, vert) montrant la spécificité neuronale de la surexpression du A_{2A}R dans les souris AAV2/5-CBA-tTA/TRE-A_{2A}R. Echelle = 20μm.

2. Evaluation comportementale des souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}

Dans le but d'évaluer un effet de la surexpression précoce du A_{2A}R sur les troubles mnésiques induits par la pathologie amyloïde dans le modèle APP/PS1, nous avons évalué ces animaux à l'âge de 5-6 mois. A cet âge, ces souris APP/PS1 ne présentent pas d'atteinte mnésique notable, bien qu'elles présentent déjà des déficits en termes de plasticité synaptique (Viana da Silva *et al.*, 2016). Au moyen du test d'actimétrie, aucune différence de locomotion en termes de distance parcourue et de vitesse n'a été mise en évidence entre les quatre groupes expérimentaux (Figure 62A et B). De la même façon, aucune différence n'a été constatée lors du test du labyrinthe en croix surélevé, un test évaluant le comportement de type anxieux (Figure 62C).

La mémoire spatiale a été ici évaluée par deux tests : le labyrinthe en Y et le labyrinthe de Barnes. D'une part, dans le labyrinthe en Y, lors de la première phase, les animaux ont passé le même temps dans chacun des deux bras disponibles (données non montrées). Toutefois, lors de la deuxième phase du test X heures après l'apprentissage, les animaux WT, A_{2A}R_{Neur} et APP/PS1 montrent une préférence significative pour le nouveau bras par rapport aux deux bras déjà explorés lors de l'apprentissage (indice de discrimination) (Figure 62D). En revanche, les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} ne montrent aucune préférence pour aucun des bras, témoignant d'une atteinte de leur mémoire spatiale. D'autre part, durant le labyrinthe de Barnes, l'ensemble des souris des différents groupes ont appris à retrouver le trou cible au fur et à mesure des jours d'apprentissage (Figure 62E). Toutefois, on peut noter une différence significative au dernier jour entre les souris WT et les souris APP/PS1 et APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}, les premières retrouvant le trou cible plus rapidement que les suivantes (Figure 62E). Le jour de la phase de rétention, lorsque la boîte d'échappement a été retirée – et à la manière des résistants dans le labyrinthe en Y – les souris WT, A_{2A}R et APP/PS1 montrent une préférence nette pour le quadrant cible (« T ») par rapport aux autres quadrants (« O ») (Figure 62F). Néanmoins, les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} ne montrent pas de préférence pour aucun quadrant, montrant là encore une altération de leur mémoire spatiale (Figure 62F).

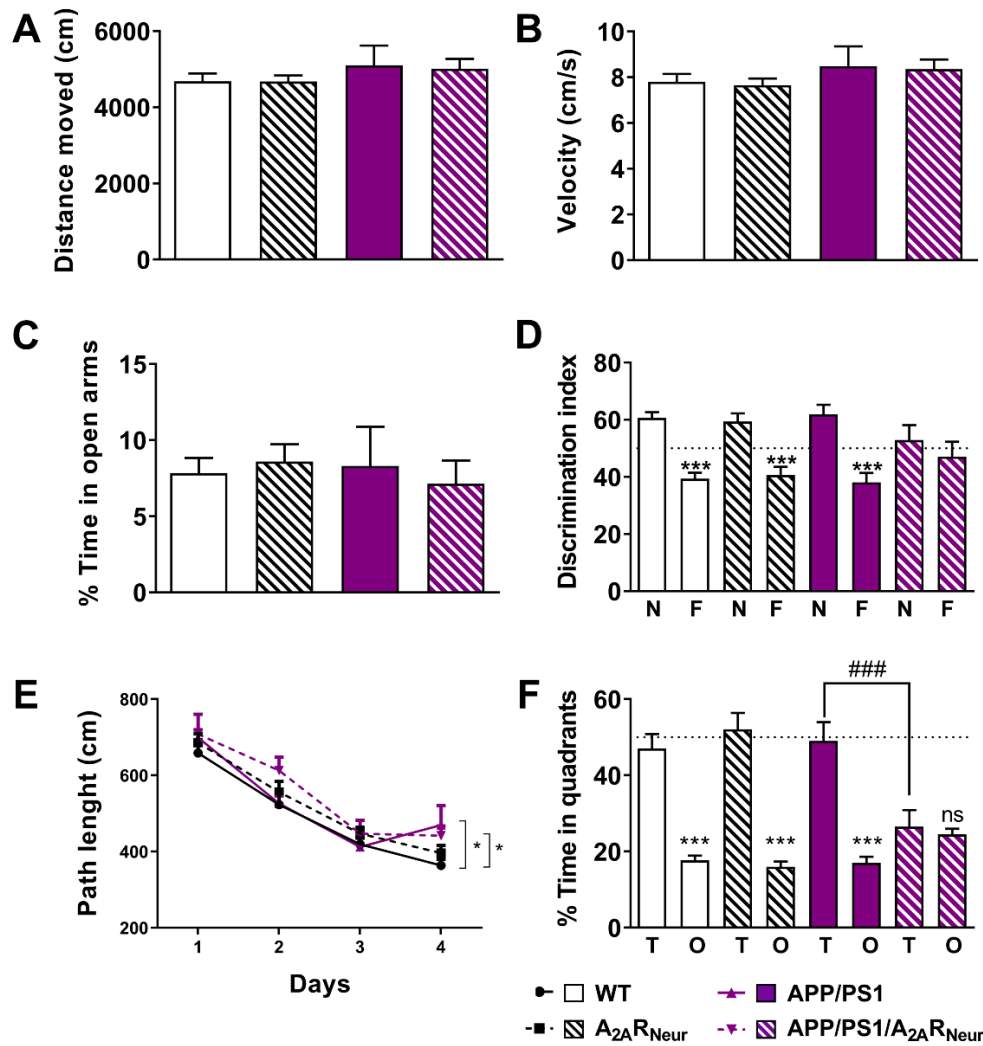


Figure 62 : La surexpression neuronale du A_{2A}R favorise les déficits de mémoire spatiale dans les souris transgénique APPsw/PS1de9. Les effets de la surexpression neuronale du A_{2A}R ont été évalués sur l'activité spontanée, le comportement de type anxieux, l'apprentissage spatial et la mémoire des souris APPsw/PS1de9. (A-B) Aucun changement de l'activité locomotrice spontanée ou de vélocité n'a été observé dans le test d'actimétrie. (C) Le comportement de type anxieux a été évalué par le labyrinthe en croix surélevé. Les quatre groupes de souris passent très peu de temps dans les bras ouverts, d'avantage anxiogène, sans différence intergroupe. (D) L'évaluation par le labyrinthe en Y a montré que les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} ont une altération de leur mémoire spatiale contrairement aux autres groupes. ***p<0,001 vs WT en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de Fisher. (E) L'évaluation de la mémoire spatiale en utilisant le labyrinthe de Barnes a révélé que tous les groupes d'animaux ont appris la position de la boîte d'échappement au cours des quatre jours d'apprentissage. Au 4^{ème} jour on peut noter que les souris sous fond génétique WT ont une meilleure performance que les souris sous fonds génétique APP/PS1. *p<0,05 vs WT en utilisant le test Two-Way ANOVA. (F) Durant la phase de rétention, les souris WT, A_{2A}R_{Neur} et Tau présentent une préférence significative pour le quadrant cible, sans différence entre ces différents groupes. Néanmoins, les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} ne montre aucune préférence pour le quadrant cible (T) par rapport aux autres quadrants (others, O), montrant une altération significative de leur mémoire spatiale. ***p<0,001 vs quadrant cible T, ###p<0,001 vs quadrant cible T des souris APP/PS1 en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de Fisher. N = 10-28 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

3. Evaluation biochimique d'A β dans les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}

Afin d'expliquer l'apparition précoce des troubles cognitifs des APP/PS1/A_{2A}R_{Neu} nous avons évalué la pathologie amyloïde, qui est la cause des troubles cognitifs de ce modèle. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence de différence en termes de nombre et de taille de plaques ni dans la quantité de peptides amyloïdes A β ₁₋₄₂ (la forme la plus toxique) ou A β ₁₋₄₀, ni dans le ratio A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀. Ces données préliminaires suggèrent qu'il n'y a pas de modification de la voie amyloïdogénique induite par la surexpression neuronale du A_{2A}R. Dès lors, nous avons analysé une autre composante lésionnelle de ces souris, la neuroinflammation.

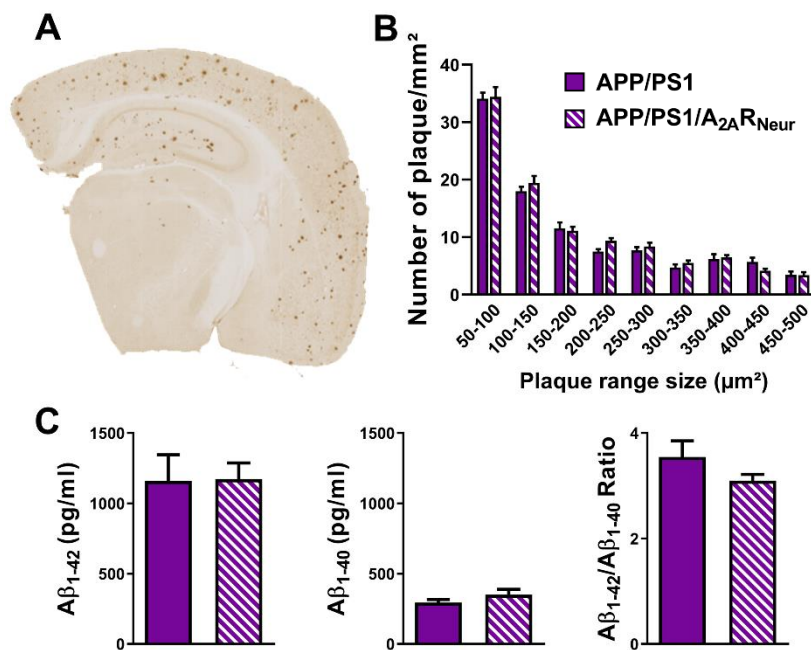


Figure 63 : Analyse de la production et de l'agrégation des peptides amyloïdes A β dans les souris APP/TRE/A_{2A}R_{Neur}. (A) Image représentative de l'immunohistochimie utilisant un anticorps 6E10 anti-A β dans le cortex et l'hippocampe d'une souris APP/TRE/A_{2A}R_{Neur}. (B) Distribution des plaques amyloïdes classées par taille dans l'hippocampe. (C) Quantification par ELISA des niveaux de peptides amyloïdes A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₄₀ ainsi que du ratio A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀. N = 9-14 par groupe. Aucune différence n'a été mise en évidence par le test One Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de fisher ou par test de Student (C). Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

4. Evaluation de la neuroinflammation des souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}

Nous avons voulu ensuite, à la façon de l'étude sur les souris Tau, vérifier les niveaux d'inflammation constitutive du modèle, mais également les marqueurs de la signature microgliale retrouvée associée à l'augmentation neuronale du A_{2A}R dans le modèle THY-Tau22 (C1q, Trem2, Csf1r). Comme attendu, nous avons observé une augmentation de marqueurs inflammatoires classiques (Cd68, Tlr2, Gfap, Il1b, Ccl3 et Ccl4) chez les souris APP/PS1 par rapport aux souris WT (Figure 64). Toutefois, la surexpression neuronale du A_{2A}R n'a pas modifié les niveaux d'expression de ces marqueurs, tant bien chez les WT que chez les APP/PS1. De façon surprenante, aucun marqueur parmi ceux impliqués dans le modèle Tau/A_{2A}R_{Neur} n'est retrouvé augmenté dans le modèle APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}, suggérant que les déficits observés ne sont pas liés à un mécanisme similaire à celui que nous avons observé dans un contexte de tauopathie Figure 65. Par ailleurs, un séquençage de l'ARNm n'a pas non plus montré de modification significative dans l'expression du transcriptome entre les souris APP/PS1 et APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} (données non montrées).

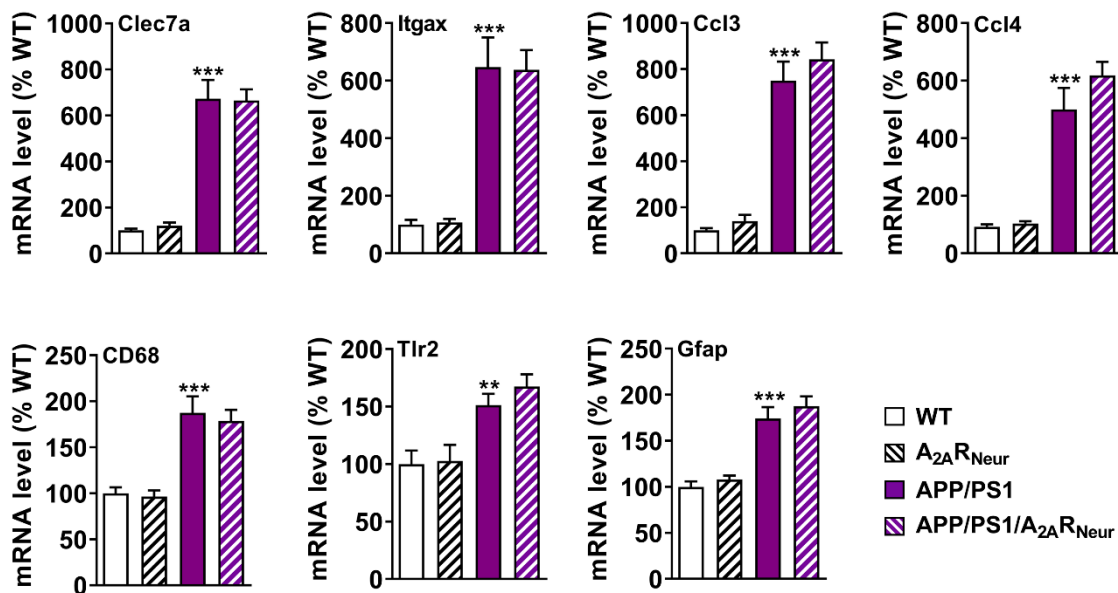


Figure 64 : Evaluation de marqueurs inflammatoires classiquement retrouvés augmentés dans les souris APPsw/PS1dE9 (Faivre *et al.*, 2018) par PCR quantitative. N= 9-15 par groupe. **p<0,01, *p<0,001 vs WT en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de Fisher. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.**

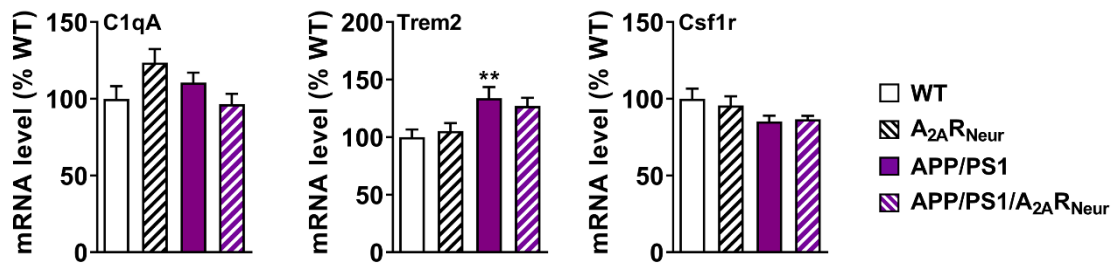


Figure 65 : Evaluation de l'expression des gènes microgliaux impliqués dans le modèle Tau/A_{2A}R_{Neur} par PCR quantitative. N= 9-15 par groupe. **p<0,01 vs WT en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de Fisher. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

5. Evaluation protéomique et transcriptionnelle des souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}

Afin d'évaluer l'impact de l'augmentation neuronale du A_{2A}R dans le modèle APP/PS1, nous avons réalisé une étude protéomique pour déterminer les quantités de chaque protéine présentes dans ce modèle. Nous avons trouvé un grand nombre de protéines modifiées de façon quantitative dans l'hippocampe des souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} par rapport aux souris APP/PS1 (Figure 66A et B). Ainsi, sur un ensemble de 177 protéines significativement dysrégulées nous retrouvons 115 protéines sous-exprimées et 62 protéines surexprimées. L'analyse par les outils DAVID et STRING révèle que la fonction la plus dérégulée pour les protéines surexprimées est associée aux exosomes extracellulaires et à la gaine de myéline (Figure 67A et B), tandis que les protéines sous-exprimées sont associées à la fonction synaptique (Figure 67C et D).

Nous avons ensuite comparé ces résultats à ceux obtenus en transcriptomique. Ceux-ci ne révèlent aucune différence d'expression génique significative (Figure 66C). Toutefois, nous avons voulu voir si les variations de protéines observées en protéomiques étaient le reflet de variations transcriptomiques. A ce titre, nous avons donc comparé par carte de chaleur les variations d'expression des gènes des 177 protéines identifiées précédemment. De façon surprenante, il n'y a aucune corrélation entre les deux analyses, ce qui suggère que les variations protéiques dans ce modèle ne sont pas liées à des modifications de l'expression génique (Figure 66C).

6. Conclusion

Ce travail montre que la surexpression neuronale du A_{2A}R favorise le développement de troubles mnésiques dans les souris transgéniques développant la pathologie tau ou amyloïde. Cependant, bien que les 2 modèles mènent à des remaniements synaptiques pathologiques, le

mécanisme est différent. Là où tau médie une dégénérescence synaptique liée à la réactivation du complément C1q, le récepteur A_{2A}R dans un contexte de pathologie amyloïde induit une perte de marqueurs synaptiques dont l'origine reste à déterminer. Cette diminution pourrait impliquer une augmentation de la toxicité du peptide amyloïde médiée par A_{2A}R ou un mécanisme non élucidé. Nous sommes actuellement entrain d'évaluer ces pistes, notamment en validant les résultats de protéomiques et en investiguant, par des modèles *in vitro*, l'interaction entre A_{2A}R et les oligomères d'A β .

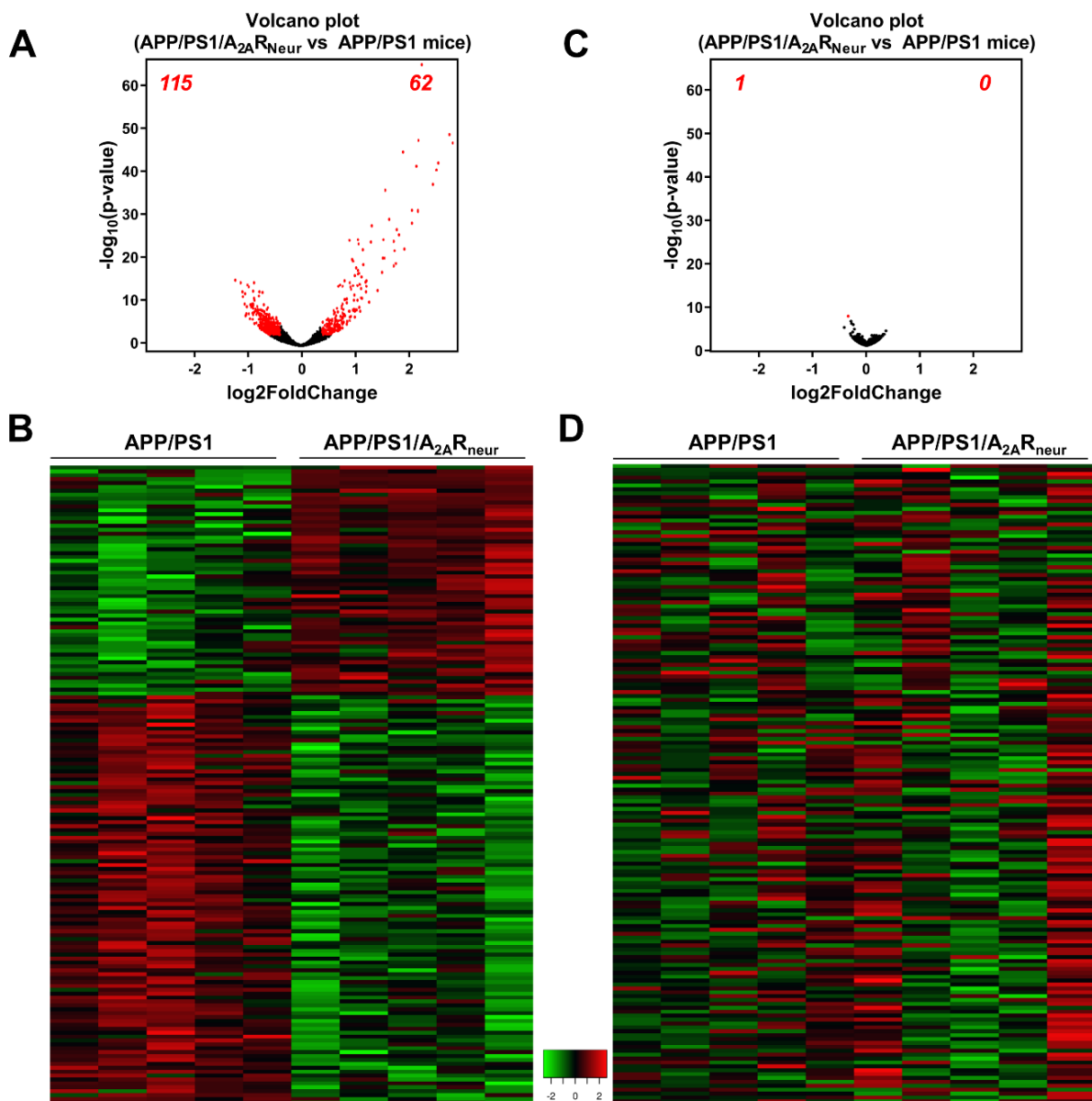


Figure 66 : Analyse protéomique et transcriptomique des souris APP/PS1 et APP/PS1/A_{2A}R_{neur}. (A) En protéomique, le *volcano plot* montre qu'un grand nombre de protéines sont différemment régulées entre les APP/PS1 et APP/PS1/A_{2A}R_{neur} ($p\text{-adjusted value} < 0,05$ et $\text{Log}_2\text{FoldChange} > 0,32$; $n=177$). (B) La carte de chaleur montre une majorité de protéines dont les niveaux sont diminués chez les APP/PS1/A_{2A}R_{neur}. (C) En transcriptomique, le *volcano plot* ne montre pas de différence entre les

groupes APP/PS1 et APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}. (D) Une carte de chaleur a été générée pour les gènes codants les protéines modifiées en protéomique. Aucune différence n'est observée en transcriptomique, suggérant que la perte protéique dans ce modèle n'est pas due à une diminution d'expression génique.

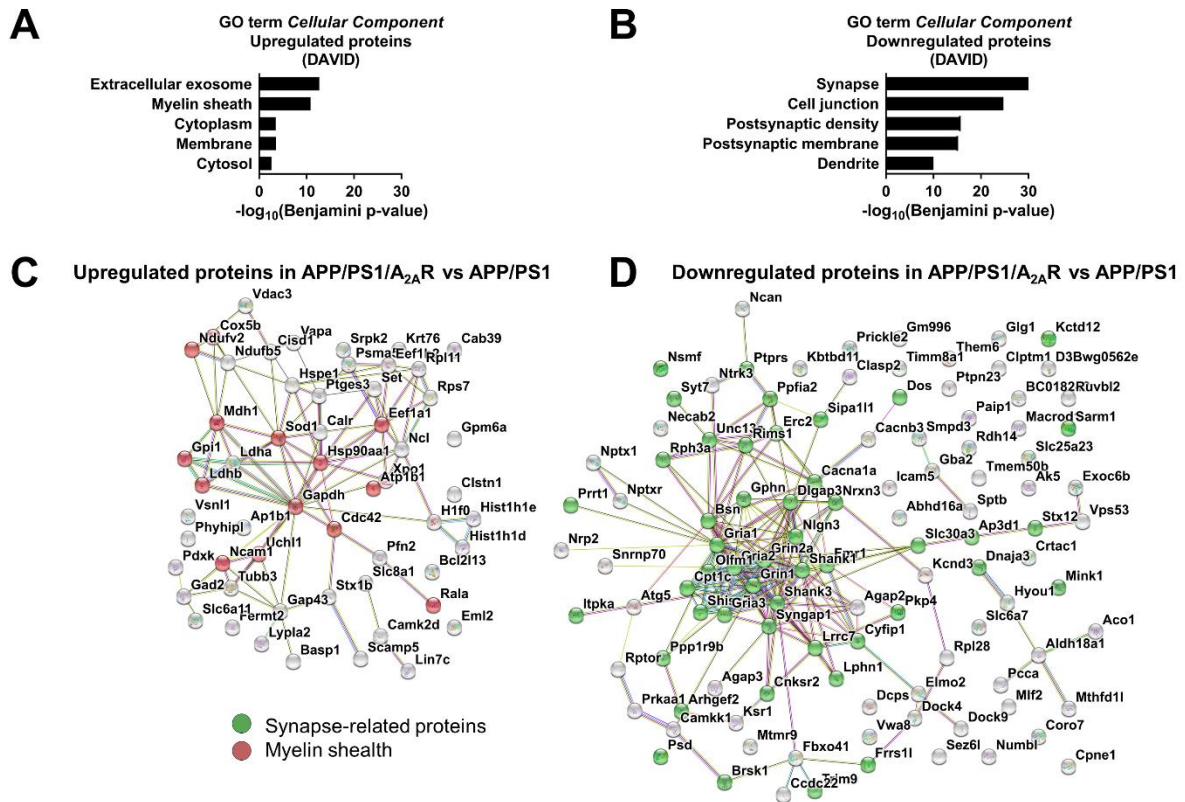


Figure 67 : L'analyse protéomique révèle que les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} présente une diminution des niveaux de protéines impliqués au niveau synaptique. L'annotation fonctionnelle des 99 protéines augmentées et des 177 protéines diminuées dans les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur} vs APP/PS1 a été réalisé sur le logiciel DAVID pour les GOTERM_Cellular Component. L'analyse révèle une association significative des protéines augmentées avec les exosomes extracellulaires et les gaines de myéline (A) alors que les protéines diminuées sont associées à la synapse, aux jonctions cellulaires, à la densité post-synaptique et aux dendrites (D). Il est à noter que l'enrichissement des protéines associés aux synapses sont nettement plus significatifs que ceux lié aux exosomes ou aux gaines de myéline (Benjamini p-value). Les interactions protéiques connues et putatives des gènes ont été analysées par la base de données en ligne STRING pour les 99 protéines augmentées (C) et pour les 177 protéines diminuées (D) dans les souris APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}. Cette analyse révèle un important regroupement de protéines diminuées liées aux synapses (D, en vert) et augmentées liées aux gaines de myéline (C, en rouge).

Partie III : Surexpression astrocytaire du A_{2A}R dans un modèle *in vitro*

Le deuxième axe de ma thèse a été d'évaluer les conséquences de la dysrégulation astrocytaire du A_{2A}R, d'une part, dans un modèle *in vitro* de cultures primaires d'astrocytes, et d'autre part, *in vivo*, dans les souris THY-Tau22. Les résultats de la partie III ont fait l'objet d'une publication, : Paiva*, Carvalho*, *et al.*, *Glia* 2019.

1. Caractérisation de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R

Afin de comprendre l'impact de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R, nous avons utilisé des cultures primaires d'astrocytes infectées avec des lentivirus codant soit pour le A_{2A}R murin soit pour la GFP, comme contrôle. Nous avons tout d'abord réalisé une immunocytochimie des cellules non infectées afin d'évaluer la pureté relative de la culture primaire. Nous avons observé un grand nombre d'astrocytes : 79% de cellules GFAP⁺ (marqueur astrocytaire standard), 14% de cellules Iba1⁺ (marqueur microglial), 0% de cellules NeuN⁺ et 2,6% de cellules β -tubulin III (marqueurs neuronaux), 0,42% de cellules MBP⁺ et 0% de cellules O4⁺ (marqueurs oligodendrocytaires) et 0% de cellules CD31⁺ (marqueur endothélial) (Figure 68A-G). Le pourcentage de cellules totales infectées est de 72%, suggérant ainsi que la majorité des cellules infectées sont des astrocytes.

Nous avons confirmé la surexpression du A_{2A}R via qPCR, western blot et immunohistochimie (Figure 69). En s'appuyant sur des images à très fort grossissement nous avons été en mesure de comparer la localisation cellulaire des A_{2A}R en condition contrôle (astrocytes surexprimant la GFP) et en condition de surexpression astrocytaire du A_{2A}R (Figure 69A-H). Dans les cellules contrôles, le A_{2A}R endogène est localisé à la membrane de façon prédominante, avec un marquage typique de récepteurs membranaires en formes de points (« puncta ») (Figure 69A-D). Tandis que dans cellules surexprimant le A_{2A}R, le A_{2A}R est retrouvé à la fois au niveau membranaire et dans le cytoplasme (Figure 69E-H). Au niveau morphologique, nous n'avons pas mis en évidence d'altération évidente liée à la surexpression du A_{2A}R. Bien que la surexpression astrocytaire du A_{2A}R ne module pas l'expression de la GFAP (Figure 69I et J), nous avons observé une augmentation significative du niveau de vimentine (Vim) (Figure 69K). Le test de viabilité, basé sur la libération d'adénylate kinase dans le milieu, montre une modeste augmentation de la toxicité dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R (Figure 69L). Enfin, nous avons évalué le métabolisme cellulaire par un

test au MTT et n'avons pas mis en évidence de différence entre les deux conditions expérimentales (Figure 69L).

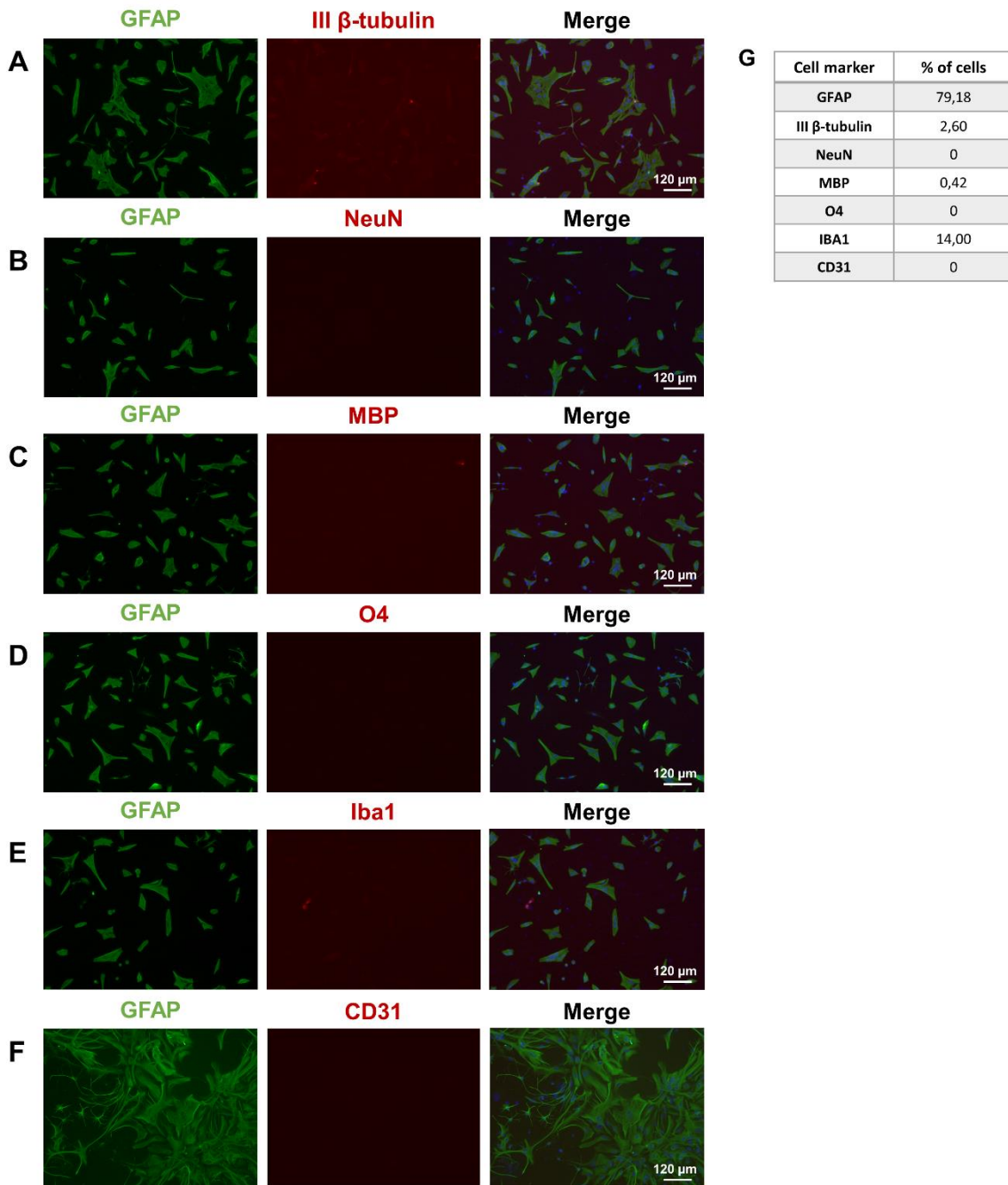


Figure 68 : Caractérisation des cultures primaires d'astrocytes. Immunofluorescence des cultures primaires d'astrocytes issues de souris avec des anticorps dirigés contre un marqueur astrocytaire (GFAP, A-F), deux marqueurs neuronaux (Tubuline- β -III et NeuN, A-B), deux marqueurs d'oligodendrocytes (MBP et O4, C-D), un marqueur microglial (Iba1, E) et un marqueur endothélial (CD31, F). Les noyaux ont été marqué avec du DAPI (bleu). (G) Le pourcentage d'enrichissement de chaque population cellulaire a été obtenu en faisant un ratio entre le nombre de cellules marquées divisé par le nombre de cellules totales (DAPI). Le marqueur astrocytaire montre un enrichissement important, avec 79% de cellules GFAP⁺. Echelle = 120 μ m.

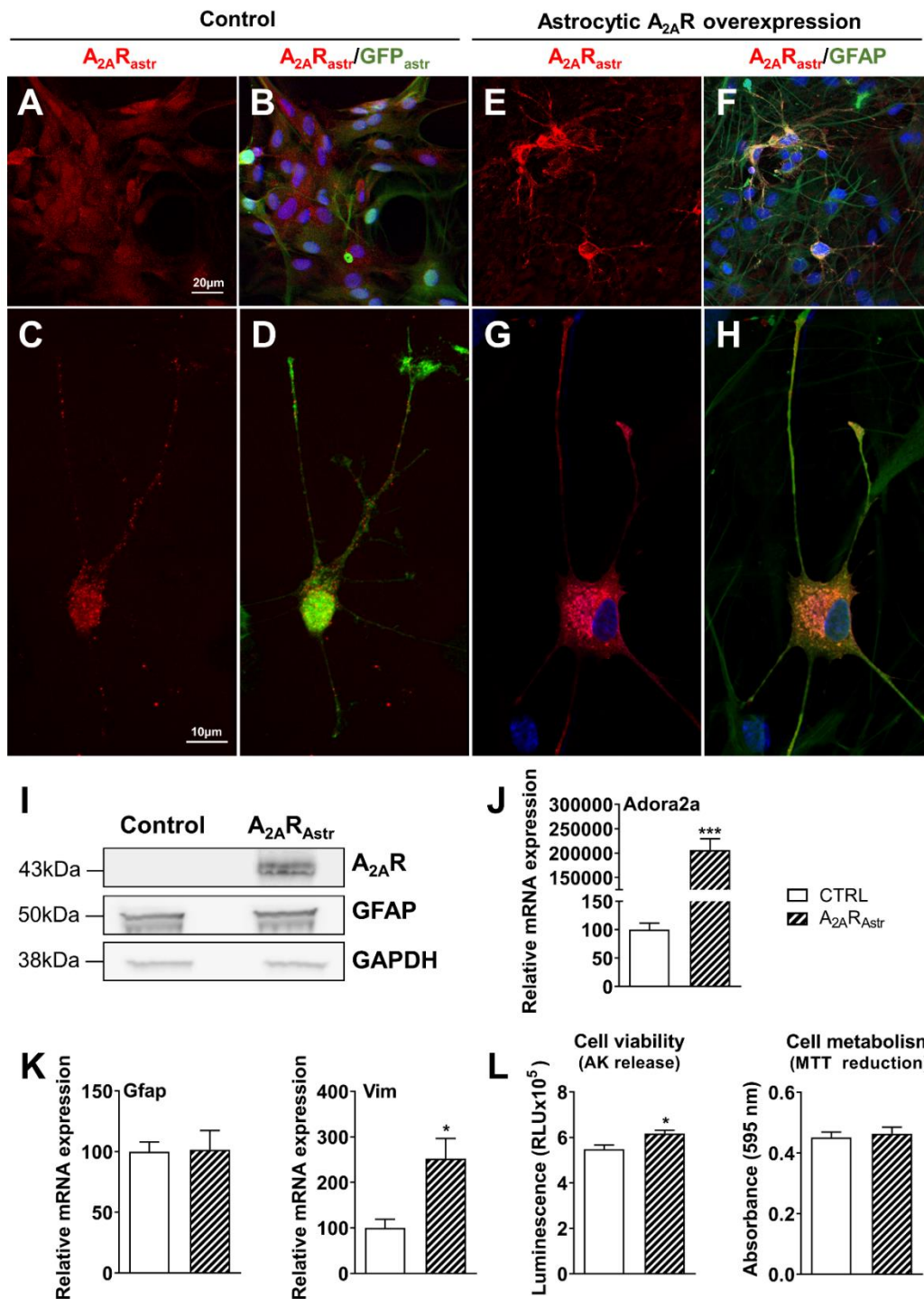


Figure 69 : Caractérisation de la surexpression du A_{2A}R en culture primaire d'astrocytes. (A-H) Images d'immunofluorescences représentatives d'astrocytes surexprimant soit la GFP (A-D) soit le A_{2A}R (E-H). Le A_{2A}R surexprimé est représenté en rouge (A-H), la GFP (A-D) et la GFAP (E-H) sont représentées en vert. Echelle = 20 µm (faible grossissement) ou 10 µm (fort grossissement). Immunoempreinte (I) et PCR quantitative (J) confirmant la surexpression du A_{2A}R par lentivirus dans les astrocytes. L'expression du marqueur GFAP n'est pas modifié lors de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R (I, K). L'expression de la vimentine est augmentée dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R (K). Les analyses par toxilight basé sur la libération d'adénylate kinase dans le milieu et le test au MTT ont été utilisé pour vérifier la viabilité cellulaire ainsi que leur métabolisme, respectivement. *p<0,05, ***p<0,001 vs Control en utilisant le test de Student. N = 4-5/groupe.

2. Evaluation transcriptomique de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R

Nous avons ensuite identifié les modifications transcriptomiques induites par la surexpression astrocytaire du A_{2A}R. A cette fin, nous avons réalisé un séquençage de l'ARN dans des cultures primaires d'astrocytes surexprimant le A_{2A}R ou la GFP (notre contrôle). L'analyse de principal composant (PCA) basée sur les données du séquençage de l'ARN montre une séparation claire entre les deux groupes expérimentaux (Figure 70A). La surexpression du A_{2A}R (*Adora2a*) a été confirmée par le séquençage avec un $\log_2\text{FoldChange}=4,9$ entre les astrocytes surexprimant le A_{2A}R et le groupe contrôle. Un graphique MA, représentant le log ratio (M) et le mean average (A), révèle une dysrégulation transcriptionnelle robuste associée à l'expression astrocytaire du A_{2A}R (Figure 70B). Une carte de chaleur (« heatmap ») confirme également une régulation différentielle des gènes exprimés entre les astrocytes surexprimant le A_{2A}R et les contrôles (Figure 70C). En utilisant une *p-adjusted value* stringente <0,01, nous retrouvons 432 gènes significativement modifiés. Parmi eux, 186 ont une expression augmentée et 246 une expression diminuée. L'analyse différentielle révèle que les 2 gènes dont l'expression est la plus augmentée, après le A_{2A}R, sont la secretogranin II/Chromogranin C (*Scg2*) ($\log_2\text{FoldChange} =4,39$) et l'Ill1 β ($\log_2\text{FoldChange} =2,40$). A contrario, le gène dont l'expression est la plus diminuée, la lipoprotein lipase (*Lpl*), n'a qu'un $\log_2\text{FoldChange} =-1,00$. De façon intéressante, la lipocalin-2 (*Lcn2*), un marqueur inflammatoire précédemment associé à la maladie d'Alzheimer (Naudé *et al.*, 2012), est retrouvé significativement augmenté ($\log_2\text{FoldChange} =1,56$).

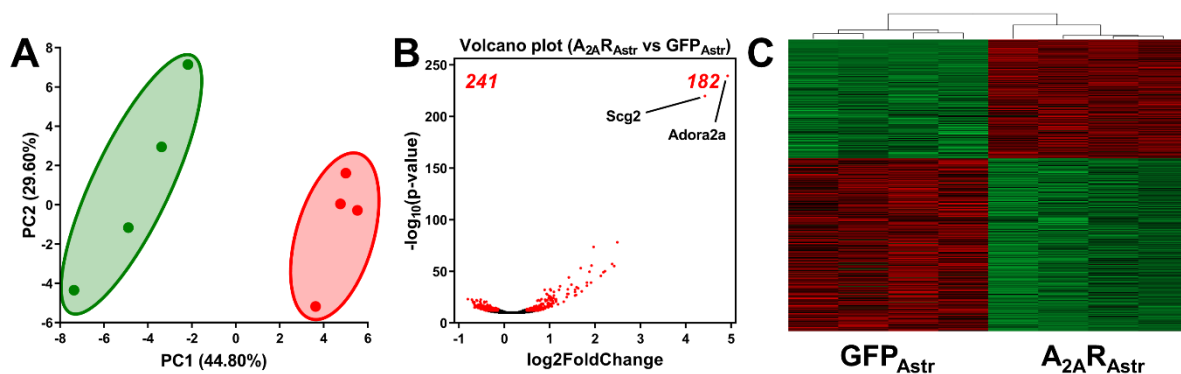


Figure 70 : La surexpression du A_{2A}R_{Astr} induit une large dysrégulation transcriptionnelle. (A) L'analyse de composante principale (PCA) révèle que les groupes GFP_{Astr} et A_{2A}R_{Astr} ont une réponse transcriptionnelle différente. (B) Un volcano plot a été généré à partir des données d'expression différentielle des gènes entre les deux groupes GFP_{Astr} et A_{2A}R_{Astr}. Le $\log_2\text{FoldChange}$ pour chaque gène a été placé sur l'axe x et la valeur p-ajustée a été placée sur l'axe y. Chaque point représente un gène et les gènes avec une *p-adjusted value* < 0,01 ont été mis en rouge. (C) La carte de chaleur

montre que les gènes différenciellement exprimés entre les A_{2A}R_{Astr} et GFP_{Astr}. Les couleurs chaudes représentent les gènes dont l'expression est augmentée et les couleurs froides représentent les gènes dont l'expression est diminuée. La carte de chaleur a été générée en montrant les gènes dont le $\log_2\text{FoldChange} > 0,25$, la moyenne de base $> 25,00$ et la $p\text{-adjusted value} < 0,05$.

Afin d'évaluer les voies moléculaires affectées par la surexpression du A_{2A}R dans les astrocytes, nous avons réalisé une analyse de voies (« pathway analyses ») en utilisant le logiciel en ligne ToppGene. En utilisant un seuil à $p\text{-adjusted value} < 0,01$ pour les gènes significativement dérégulés, nous avons identifiés plusieurs voies impactées. De plus, la surexpression du A_{2A}R impacte des gènes impliqués dans l'activation et la migration cellulaire, ainsi que la réponse immunitaire et l'angiogenèse (Figure 71A). Nous avons ensuite séparé les gènes dont l'expression était augmentée de ceux dont l'expression était diminuée. Les processus liés à la réponse immunitaire et à l'activation cellulaires sont plutôt associés aux gènes sous-exprimés (Figure 71B) alors que l'angiogenèse est principalement liée aux gènes surexprimés (Figure 71C).

Nous avons également comparé nos résultats avec une base de données disponible publiquement de gènes liés à la réactivité astrocytaire (Liddelow *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que 10 marqueurs d'astrocytes réactifs sont d'avantage exprimés dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R par rapport aux astrocytes contrôles : cinq gènes sont associés à la réactivité globale (« pan reactive ») (Osmr, Lcn2, S1pr3, Timp1, Steap4), deux associés à un état neurotoxique A1 (Fbln5, Srgn) et quatre à un état neuroprotecteur A2 (Cd14, Ptgs2, Ptx3, Tgm1) (Zamanian *et al.*, 2012). Les marqueurs A1 sont particulièrement liés aux processus neurodégénératifs (Liddelow *et al.*, 2017). Nous avons ensuite utilisé les récentes données transcriptomiques astrocytaire liées au vieillissement physiologique et avons retrouvés 12 gènes d'avantage exprimés à la fois durant la surexpression du A_{2A}R et durant le vieillissement (Clarke *et al.*, 2018). Enfin, nous avons comparé nos résultats aux récentes données de transcriptome sur cellule unique (« single-cell ») issues de cerveaux post-mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, où nous avons identifiés 2 gènes sous-exprimés à la fois dans ces astrocytes mais également dans nos astrocytes surexprimant le A_{2A}R : le récepteur tyrosine kinase Mertk et Cry11 (Mathys *et al.*, 2019).

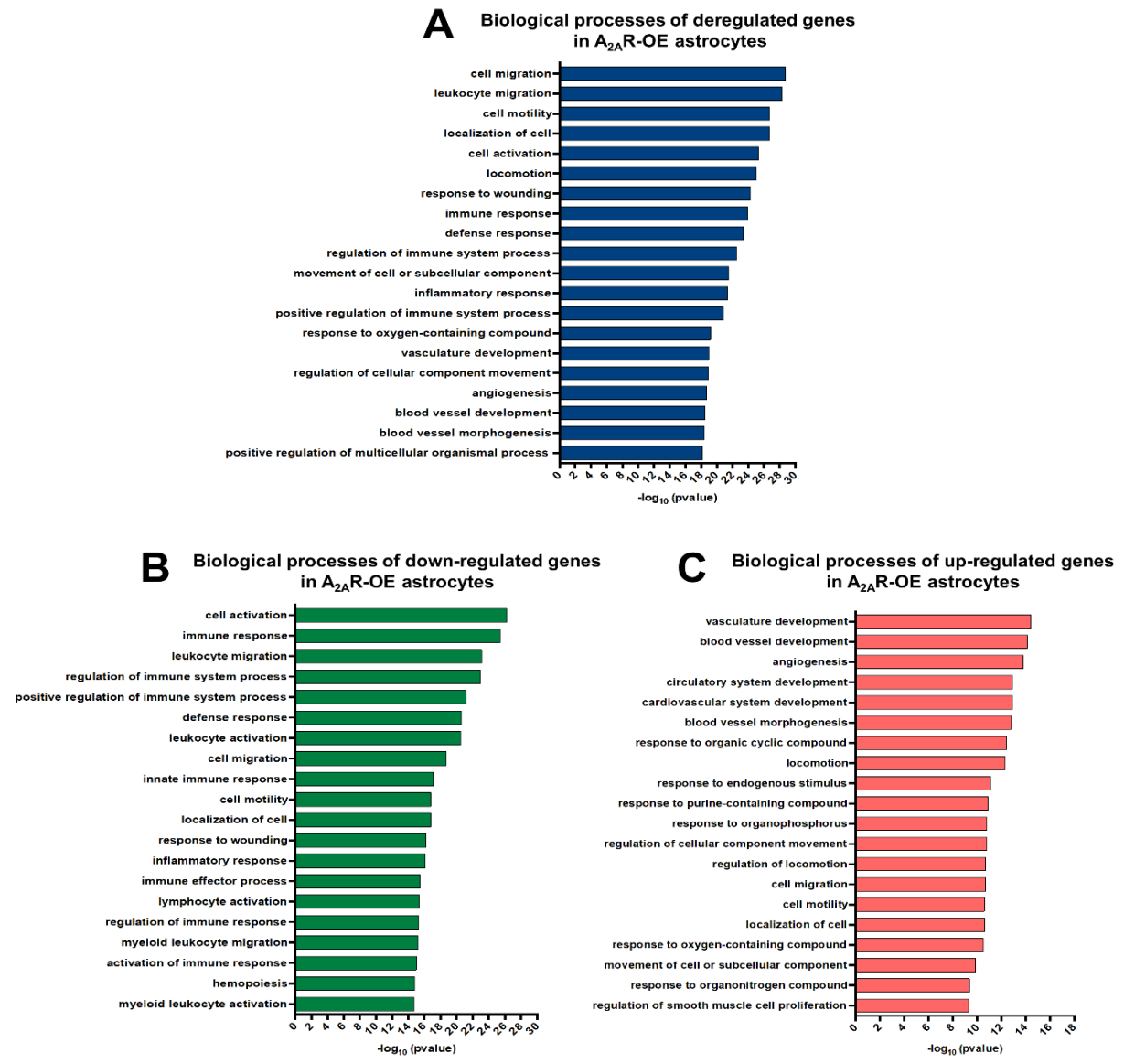


Figure 71 Les processus biologiques associés au A_{2A}R_{Astr}. Analyse par le logiciel ToppGene montrant les processus biologiques associés à l'ensemble des gènes dérégulés (p -adjusted value < 0,01) (A) ou spécifiquement des gènes surexprimés (D) ou sous-exprimés (E).

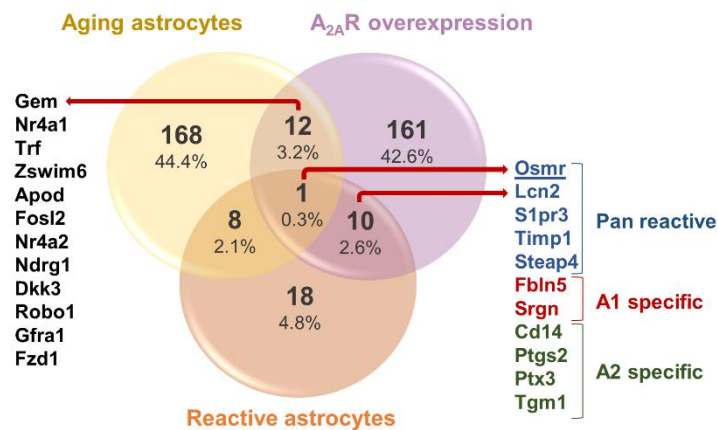


Figure 72 : La surexpression du A_{2A}R astrocytaire induit l'augmentation d'expression de gènes liés au vieillissement et à la réactivité astrocytaire. Un diagramme de Venn montre les gènes communs surexprimés entre les A_{2A}R_{Astr}, les astrocytes durant le vieillissement et les astrocytes réactifs. Les données issues du transcriptome d'astrocytes (cortex et hippocampe) durant le vieillissement a été obtenu de (Clarke *et al.*, 2018) ; et les données issues du transcriptome des astrocytes réactif a été obtenu de (Liddelow *et al.*, 2017). Les différents types de réactivité astrocytes (pan réactifs, A1 et A2 ont été classifiés dans l'article de (Zamanian *et al.*, 2012). La réactivation spécifique A1 est très associé avec les maladies neurodégénératives, tels que la maladie d'Alzheimer (Liddelow *et al.*, 2017).

3. Evaluation des gènes dérégulés par la surexpression astrocytaire du A_{2A}R

Afin d'analyser les fonctions des gènes dont l'expression est affectée par la surexpression astrocytaire des A_{2A}Rs, nous avons sélectionnés les 50 gènes dont la modification de l'expression est la plus significative (sur- et sous-exprimés, valeur *p-adj*). En utilisant la base de données de réseaux protéiques STRING, nous avons trouvé une forte interaction entre 23 des 50 gènes, incluant Adora2a. De façon intéressante, ce réseau est également formé de plusieurs gènes très fortement surexprimés tels que Il1 β , Lcn2 et *Chitinase 3 Like 1* (Chi3l1). Ces gènes pro-inflammatoires ont été précédemment liés à la maladie d'Alzheimer (Shaftel *et al.*, 2008; Naudé *et al.*, 2012; Querol-Vilaseca *et al.*, 2017). De plus, parmi les 27 autres gènes, le *Solute Carrier Family 7 Member 11* (Slc7a11) et la Scg2 sont également très fortement surexprimés.

Ensuite, afin de valider le séquençage de l'ARN, nous avons réalisé des qPCR pour Scg2, Il1 β , Chi3l1 et Slc7a11 dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R et leurs contrôles. Comme attendu, nous observons une forte augmentation de tous ces gènes en qPCR. Scg2 étant une protéine neurosécrétée et dérégulée dans plusieurs modèles de la maladie d'Alzheimer (Saura *et al.*, 2015), et servant de marqueur prédictif de la progression de la maladie (Spellman *et al.*,

2015), nous avons d'avantage exploré son niveau d'expression au niveau protéique. Nous retrouvons une forte augmentation d'expression de Scg2 dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R.

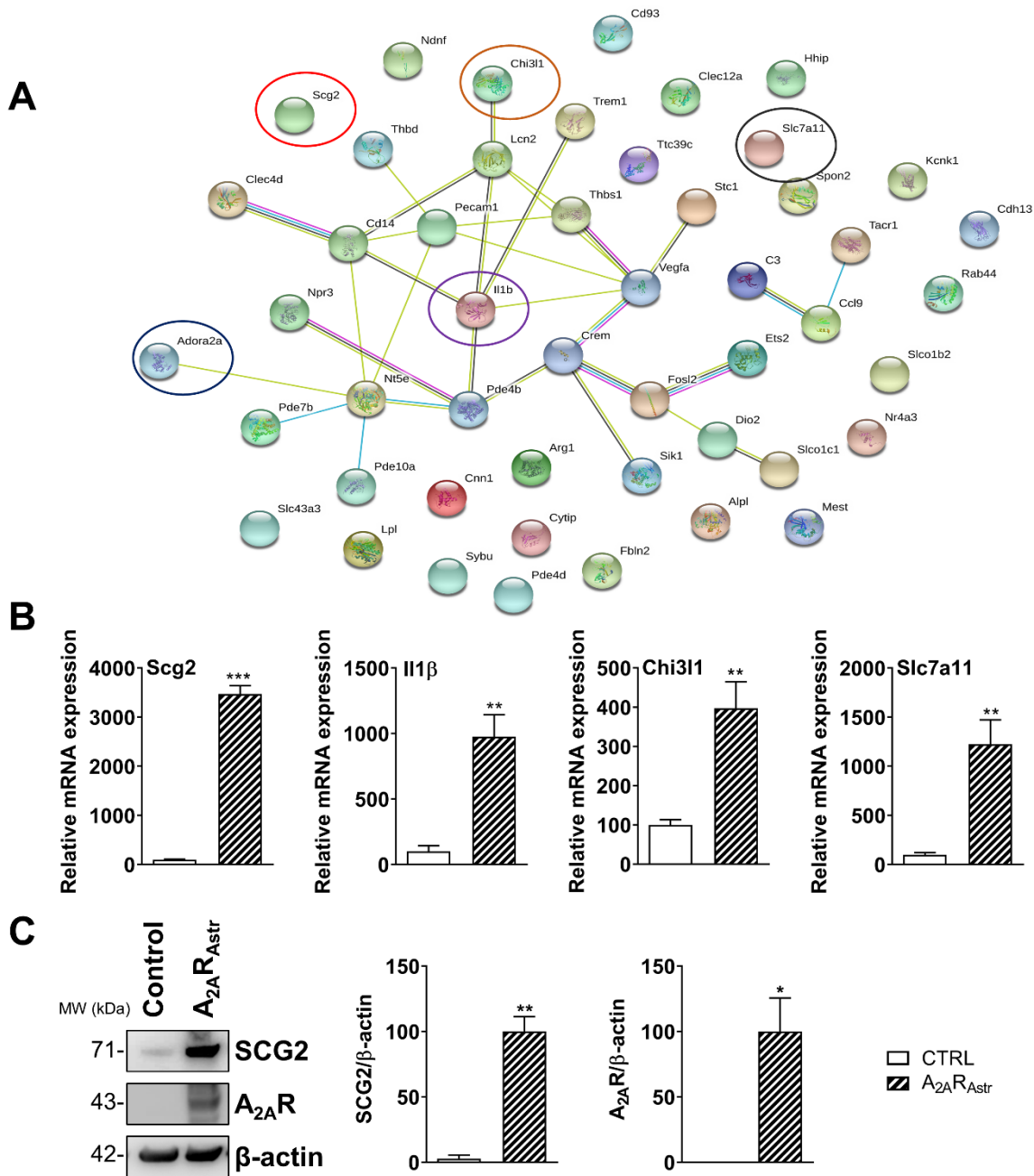


Figure 73 : Le A_{2A}R astrocytaire dérègle l'expression des gènes associés à la sécrétion et l'inflammation. (A) Une analyse des réseaux protéiques par le logiciel STRING des 50 gènes les plus dérégulés, déterminé par la plus grande *p-adjusted value*, révèle une forte interaction entre 23 gènes, inclus Adora2a (cercle bleu). (B) Les gènes les plus dérégulés, Scg2 (cercle rouge), Il1b (cercle violet), Chi311 (cercle orange) et Slc7a11 (cercle noir) ont été sélectionnés pour une validation en qPCR. (C) Quantification des immuoempreintes montrent une forte augmentation de la protéine SCH2 dans les A_{2A}R_{Astr}. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 vs Control en utilisant le test de Student. N = 5-7 par groupe.

4. Evaluation du blocage des A_{2A}R astrocytaires surexprimés

Compte-tenu de l'impact transcriptomique de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R, nous sommes demandés si le blocage sélectif du A_{2A}R, en utilisant le SCH 58261, était en mesure de restaurer la dysrégulation d'expression génique retrouvée dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R. De façon très intéressante, nous avons observé que l'expression du marqueur pro-inflammatoire Il1 β ainsi que de l'anti-transporter cystine-glutamate Slc7a11, tout deux retrouvés surexprimés dans les astrocytes surexprimant le A_{2A}R, était restaurée suite au traitement avec le SCH58261. Ce dernier restaure également le niveau basal d'expression de la vimentine. Par opposition, le traitement avec le SCH 58261 n'a eu aucun impact sur la surexpression de la Scg2 et de Chi311 liés à la surexpression astrocytaire du A_{2A}R. Ainsi, le blocage du A_{2A}R par un antagoniste restaure les effets transcriptionnels liés à la surexpression astrocytaire du A_{2A}R sur plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation, l'antitransport de cystine-glutamate et la réactivation astrocytaire.

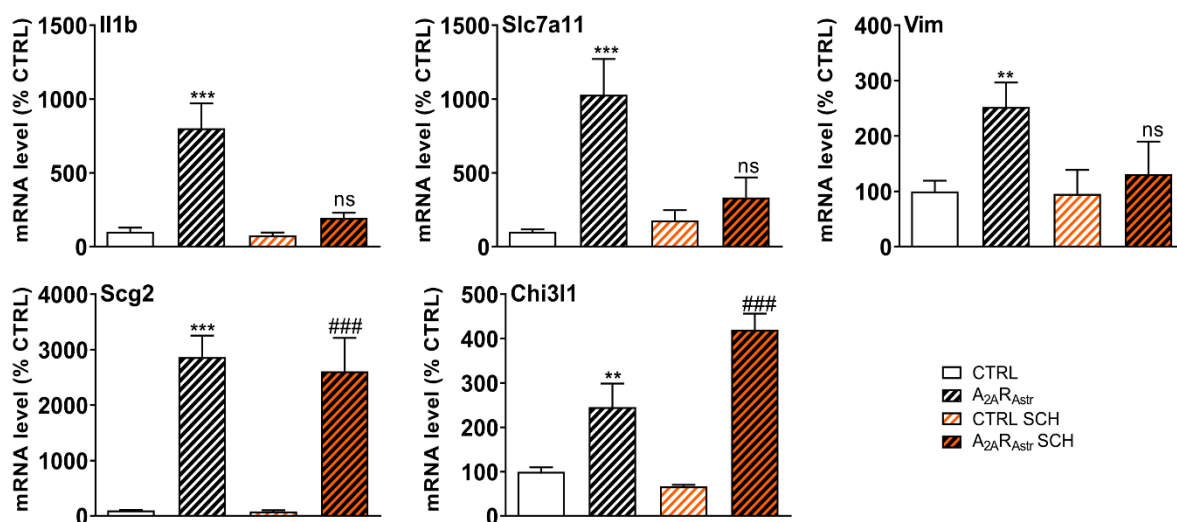


Figure 74 : Le blocage du A_{2A}R par le SCH 58261 restaure les niveaux d'expression d'Il1b, Slc7a11 et Vim dans les A_{2A}R_{Astr}. (A) Résultats de qPCR montrant les niveaux d'expression d'Il1b, Slc7a11, Vim, Scg2 et Chi311. *p<0,05, ***p<0,001 vs Control, ###p<0,001 vs Control SCH 58261 en utilisant un One-Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de Fisher. N= 3-7 par groupe.

5. Conclusion

Les récepteurs A_{2A} sont des modulateurs de nombreux processus physiologiques essentiels à l'homéostasie cérébrale et à la modulation fine du fonctionnement synaptique. Dans certaines maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, l'expression des A_{2A}Rs est augmentée de façon pathologique dans les neurones mais aussi dans les astrocytes. Dans ce contexte, l'utilisation d'inhibiteurs des A_{2A}Rs, capables de normaliser la fonction altérée de ces récepteurs, constitue une stratégie thérapeutique potentielle. Cependant, l'impact des altérations des A_{2A}Rs, plus particulièrement dans les astrocytes, est encore mal compris. Dans cette étude, nous avons exploré l'effet d'une surexpression du A_{2A}R au niveau transcriptomique dans des cultures primaires d'astrocytes. En analysant le transcriptome global, nous avons trouvé que la surexpression des A_{2A}Rs induit une modification robuste du transcriptome, en touchant particulièrement des gènes liés à la réponse immunitaire, l'angiogenèse et les gènes d'activation cellulaire. De façon importante, nous avons observé que le traitement avec un antagoniste sélectif du A_{2A}R, le SCH 58261, restaure les niveaux d'expression de plusieurs gènes liés à l'inflammation et l'activation astrocytaire, tels l'interleukin-1beta (Il1 β) et la vimentine (Vim). Ces résultats supportent l'idée que le blocage du A_{2A}R est capable de restaurer certaines fonctions altérées lors de l'expression anormale du A_{2A}R dans les astrocytes.

Enfin, nous avons profité du modèle de surexpression conditionnelle du A_{2A}R pour induire une augmentation du A_{2A}R spécifiquement dans les astrocytes des souris THY-Tau22 et ainsi mieux comprendre les conséquences d'une telle dysrégulation sur la progression de la pathologie tau et des troubles associés.

Partie IV : Surexpression astrocytaire du A_{2A} dans un modèle de tauopathie

1. Caractérisation de la surexpression astrocytaire dans un modèle murin

Dans le but d'évaluer l'impact d'une augmentation astrocytaire du A_{2A}R sur le développement de la pathologie tau et des troubles cognitifs associés, nous avons utilisé le modèle développé dans la partie I (Figure 44A). Cette augmentation astrocytaire du A_{2A}R est obtenue par le croisement d'une nouvelle lignée de souris possédant le transgène A_{2A}R murin sous contrôle d'un élément de réponse (Tet-responsive element, lignée TRE-A_{2A}R) avec un modèle transgénique exprimant une protéine transactivatrice tTA (*tetracycline-controlled transactivator protein*) sous le promoteur astrocytaire GFAP (lignée GFAP-tTA ; Figure 75A). Afin d'éviter tout effet pendant la période critique du développement périnatal, l'expression du transgène du A_{2A}R est bloquée, de l'accouplement jusqu'au sevrage des souriceaux (28^{ème} jour après la naissance, P28) par un traitement à la doxycycline (Dox). Cinq mois après le retrait de la doxycycline une expression astrocytaire du A_{2A}R est détectée dans l'hippocampe, notre région d'intérêt (Figure 75B).

Afin de s'assurer de la spécificité cellulaire de la surexpression du A_{2A}R induite par le système transgénique, nous avons réalisés différents co-marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs de neurones (NeuN), de cellules microgliales (Iba1) et d'astrocytes (GFAP, S100β). Ces résultats montrent que la surexpression du A_{2A}R dans l'hippocampe est limitée exclusivement aux astrocytes (Figure 75C).

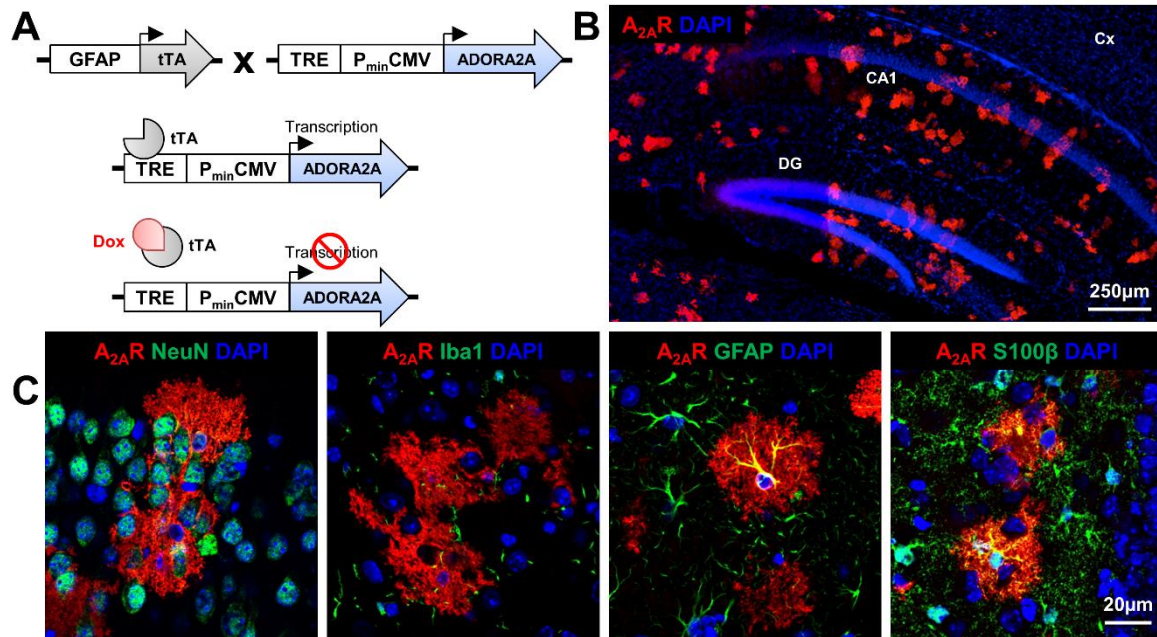


Figure 75 : Caractérisation de la surexpression du A_{2A}R dans le modèle transgénique conditionnel GFAP-tTA/TRE-A_{2A}R. (A) La surexpression conditionnelle du A_{2A}R dans les astrocytes est obtenue par le croisement de la lignée de souris GFAP-tTA, produisant la protéine transactivatrice de la tétracycline tTA sous contrôle d'un promoteur astrocytaire (GFAP), avec la lignée de souris TRE-A_{2A}R (cf. Résultats partie I). (B) Immunofluorescence représentative de la densité du A_{2A}R à 6 mois après retrait de la doxycycline à P28. (C) Différents co-marquages ont été réalisés par immunofluorescence avec un marquage du A_{2A}R (rouge) et un marquage neuronal (NeuN, vert), microglial (Iba1, vert) ou astrocytaire (GFAP et S100β, vert), montrant la spécificité astrocytaire du A_{2A}R surexprimé. Le DAPI (bleu) marque les noyaux cellulaires. Echelles = 250 μm (B) et 20 μm (C).

2. Evaluation comportementale

Dans un premier temps, les animaux âgés de 5 mois ont été évalués dans un test d'actimétrie, de façon à s'assurer que l'activité spontanée, la locomotion et l'exploration des animaux ne sont pas altérées par la surexpression du A_{2A}R astrocytaire ou la pathologie tau. Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les groupes en termes de distance parcourue ou de vélocité (Figure 76A et 6B). Les animaux ont ensuite été évalués dans le test du labyrinthe en croix surélevé, permettant de mesurer l'anxiété des animaux. Comme attendu, les souris tau passent plus de temps dans le bras ouvert, ce qui est considéré comme une désinhibition chez ce modèle. Cependant, la surexpression astrocytaire du A_{2A}R prévient l'apparition de ce phénotype (Figure 76C). Ensuite, afin d'évaluer les éventuels déficits mnésiques induits par la surexpression astrocytaire du A_{2A}R, les animaux ont été évalués dans le labyrinthe de Barnes. Aucune différence n'est mise en évidence entre les différents groupes, même si au 4ème jour les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Astr} semblent légèrement moins

performantes (Figure 76D). Lors de la phase de rétention, dans laquelle la boîte d'échappement a été retiré, les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} passent significativement moins de temps que les autres groupes dans le quadrant cible, à savoir la partie où se trouvait le trou cible (Figure 76E). La latence, correspondant au temps nécessaire à l'animal pour retrouver le trou cible, a également été évaluée : les souris tau semblent plus lentes à se rappeler l'emplacement du trou cible par rapport aux souris contrôles. Les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} mettent quant à elles significativement plus de temps que les souris Tau à retrouver le trou cible (Figure 76F). Ces premiers résultats montrent que la surexpression astrocytaire du A_{2A}R aggrave le phénotype mnésique observé des souris Tau.

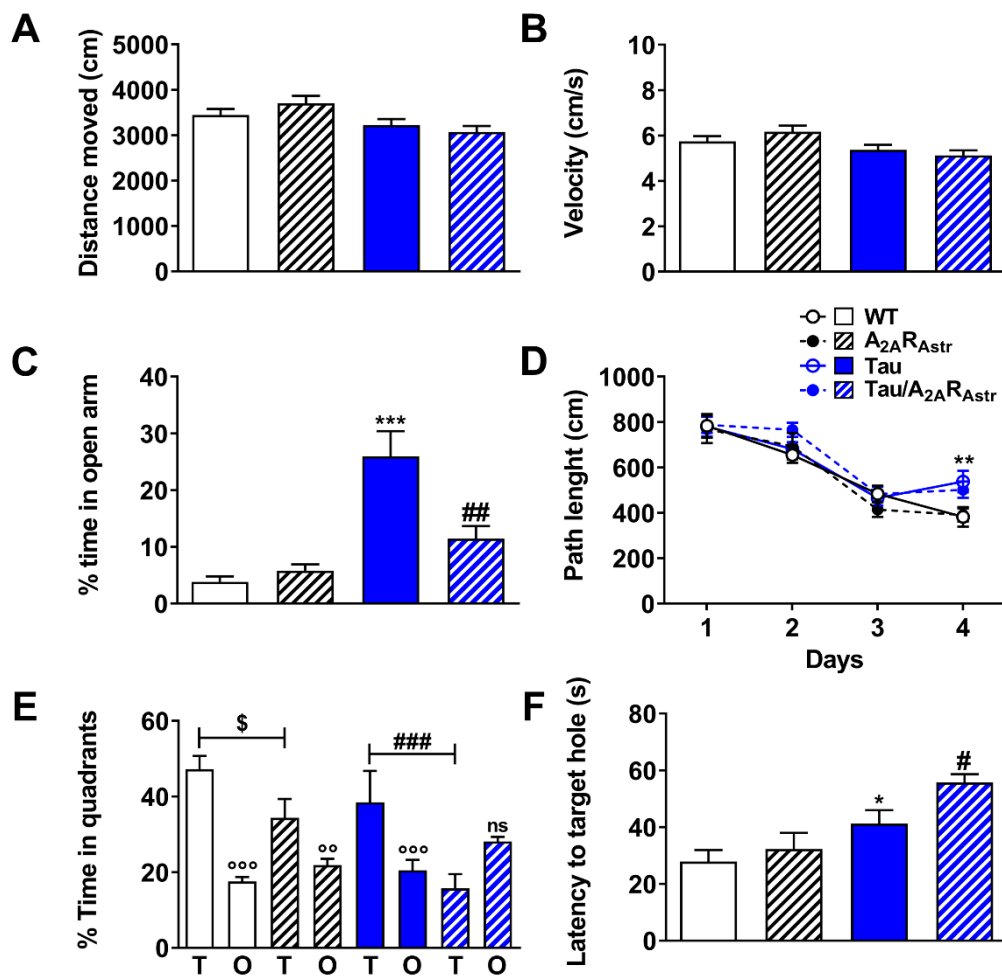


Figure 76 La surexpression astrocytaire du A_{2A}R favorise les déficits de mémoire spatiale dans les souris transgéniques THY-Tau22. Les effets de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R ont été évalués sur l'activité spontanée, le comportement de type anxieux, l'apprentissage et la mémoire spatiale des souris THY-Tau22. (A-B) Aucun changement de l'activité locomotrice spontanée ou de vélocité n'a été observé dans le test d'actimétrie. (C) Le comportement de type anxieux a été évalué par le labyrinthe en croix surélevé. Comme attendu, les souris Tau ont passé plus de temps dans le bras ouvert que les souris WT. Cependant, les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} passent moins de temps que ces dernières dans les bras ouverts, suggérant que la surexpression du A_{2A}R astrocytaire a modifié le phénotype de désinhibition des souris THY-Tau22. (D) L'évaluation de la mémoire spatiale en

utilisant le labyrinthe de Barnes a révélé que tous les groupes d'animaux ont appris la position de la boîte d'échappement au cours des quatre jours d'apprentissage. Toutefois, au 4^{ème} jour les groupes Tau et Tau/A_{2A}R_{Astr} réalisent une moins bonne performance que les souris WT. (E) Durant la phase de rétention, les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} ne montrent pas de préférence pour le quadrant cible par rapport aux autres quadrants, ce qui démontre une altération significative de leurs capacités mnésiques. (F) En accord avec la perte de mémoire, la latence correspondant au temps que les souris mettent pour rejoindre le trou cible est significativement augmentée chez les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} par rapport aux souris Tau. Ces dernières mettent également plus de temps à rejoindre le trou cible que les souris WT, dénotant également une altération mnésique. N = 14-22 par groupe. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT, #p<0.05, ###p<0.001 vs Tau, °p<0.05, °°p<0.01, °°°p<0.001 vs quadrant cible en utilisant le test Two-Way ANOVA et One-Way ANOVA suivi d'un test *post hoc* LSD de Fisher. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem.

3. Evaluation biochimique

Afin d'expliquer l'aggravation des déficits mnésiques observés chez les souris GFAP-tTa/TRE-A_{2A}R/THY-Tau22, nous avons ensuite étudié l'impact de la dysrégulation astrocytaires des A_{2A}R sur la phosphorylation et l'agrégation de la protéine tau. Nous avons évalué dans un premier temps l'effet de cette surexpression astrocytaire du A_{2A}R sur le niveau global de phosphorylation hippocampique de la protéine tau. Comme attendu, les souris Tau présentent un profil caractéristique avec plusieurs isovariants s'étalant de la région basique (point isoélectrique pI=11) à la région acide (pI=3), qui sont le reflet de différents états de phosphorylation de Tau (Figure 77A). Chez les souris Tau/A_{2A}R_{Astr}, les résultats mettent en évidence un profil de migration de la protéine tau davantage orienté vers la région acide, suggérant une augmentation globale de sa phosphorylation (Figure 77A). Après avoir vérifié que l'expression totale de la protéine tau humaine mutée était inchangée (données non montrées), nous avons analysé des sites de phosphorylations physiologiques (retrouvés phosphorylés dans le tissu sain et hyperphosphorylés chez les patient Alzheimer) et des sites pathologiques (phosphorylation retrouvée uniquement dans le tissu pathologique). Les résultats montrent une augmentation de phosphorylation des épitopes pSer396 et pSer404 chez les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} par rapport aux souris Tau (Figure 77B). De plus, l'augmentation de phosphorylation de l'épitope pThr212/Ser214 suggère une augmentation des DNFs (Figure 77B). Afin de vérifier l'étendue des DNF, nous avons utilisé l'anticorps MC1 qui reconnaît également un épitope conformationnel de tau. L'analyse immunohistochimique montre que la surface hippocampique marquée par MC1 apparaît significativement plus importante chez les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} par rapport aux souris Tau (Figure 77C). Ces résultats montrent une aggravation de la pathologie tau chez les souris Tau/A_{2A}R_{Astr} par rapport aux souris Tau.

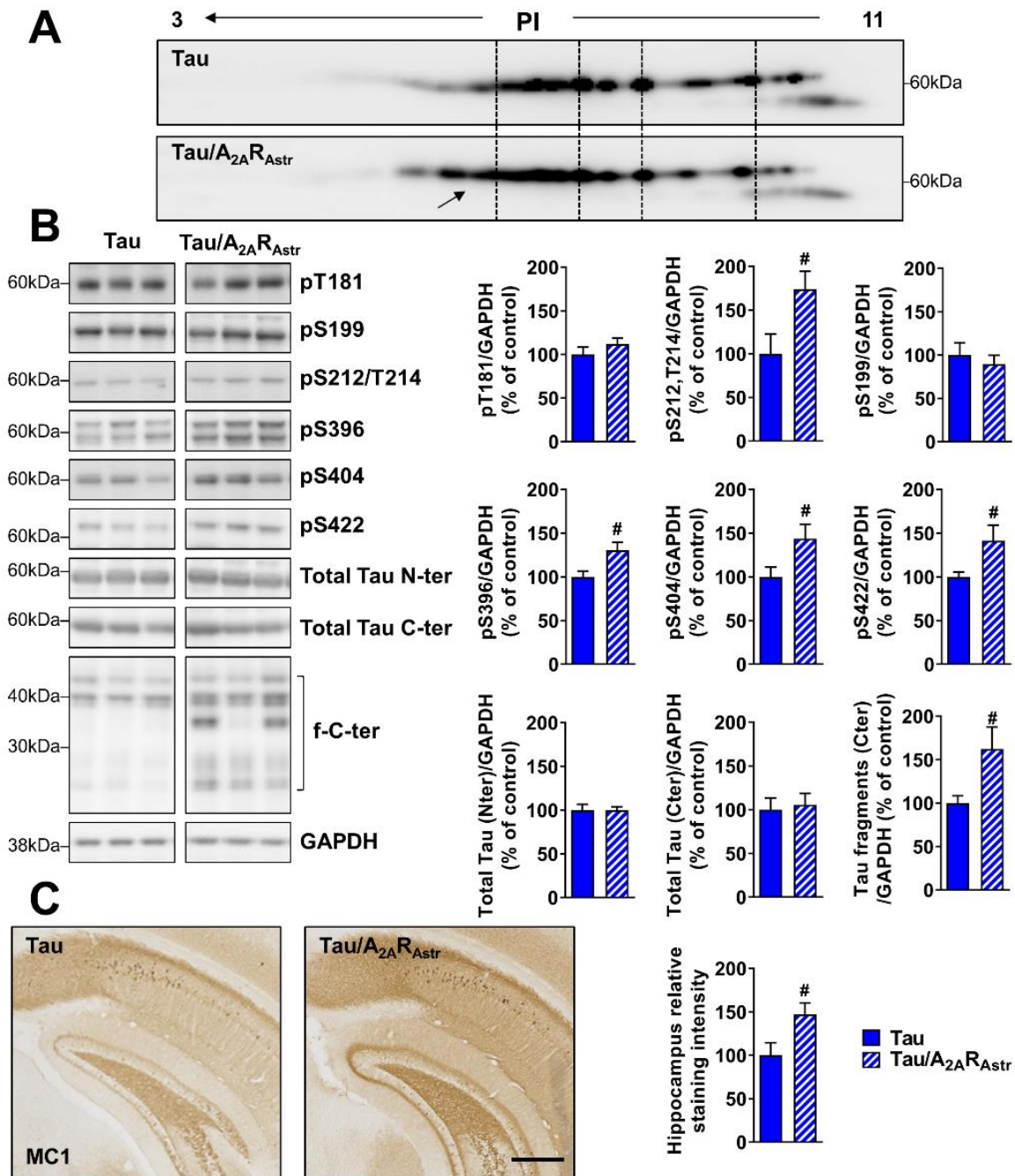


Figure 77 Evaluation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau dans les souris **Tau/A_{2A}R_{Astr}**. (A) Le profil électrophorétique de la protéine tau humaine totale (anticorps anti-tau C-ter) révèle, dans les souris Tau/A_{2A}R_{Astr}, une augmentation des isovariants de tau à point isoélectrique acide (flèche) par rapport aux souris Tau. (B) Quantification de la phosphorylation de tau sur les épitopes Thr181, Ser199, Ser212/Thr214 (AT100), Ser396, Ser404 et Ser422 dans les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Astr}. Les analyses révèlent une augmentation de phosphorylation sur les sites Ser212/Thr214, Ser396, Ser404 et Ser422. N = 6-7 par groupe. (C) Le marquage de la tau conformationnelle par l'anticorps MC1 dans les souris Tau et Tau/A_{2A}R_{Astr} montre une augmentation des formes de tau mal conformées dans le groupe Tau/A_{2A}R_{Astr}. N = 5-11 par groupe. #p<0,05 vs Tau en utilisant le test de Student. Echelle = 500 µm. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

Afin de mieux comprendre l'augmentation de pathologie tau, et en particulier l'augmentation de phosphorylation, nous avons étudié l'expression protéique et l'état de phosphorylation de plusieurs kinases de Tau. Parmi les différentes kinases et phosphatases évaluées, nous avons retrouvé une augmentation d'expression de GSK3 β et de P38 (Figure 78). Aucune différence au niveau des phosphatases n'a été mise en évidence. Ainsi, il semble que la surexpression astrocytaire du A_{2A}R favorise l'augmentation de différentes kinases de tau, pouvant expliquer l'augmentation de phosphorylation de tau.

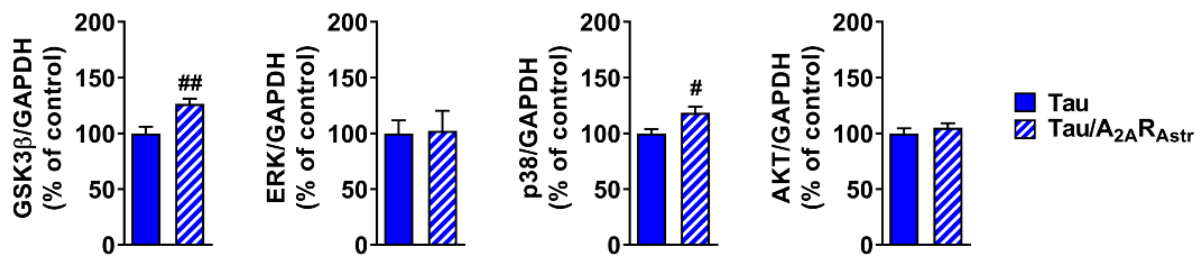


Figure 78. Evaluation de l'expression des kinases dans les souris Tau/A_{2A}R_{Astr}. Quantification des protéines par immuno-empreinte des kinases de tau (GSK3 β , ERK, p38 et AKT). N = 6-7 par groupe. [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 vs Tau en utilisant le test de Student. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem.

4. Evaluation de la neuroinflammation associée à tau

La pathologie tau est associée avec le développement d'une neuro-inflammation parenchymateuse (Bellucci *et al.*, 2004; Yoshiyama *et al.*, 2007), retrouvée chez les souris THY-Tau22 (Laurent *et al.*, 2016, 2017). Nous avons donc évalué dans notre modèle, par PCR quantitative, l'expression relative de plusieurs gènes de l'immunité innée connus pour être dérégulés dans ce modèle.

On retrouve chez les souris Tau une augmentation d'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (CCL3, CCL4) ainsi que de récepteurs inflammatoires (Clec7a, Itgax) (Figure 79A). De façon intéressante, ces marqueurs sont davantage augmentés chez les souris Tau/A_{2A}R_{Astr}. L'expression des marqueurs d'activation gliale (GFAP, CD68) ne sont pas modifiés à l'âge de 6 mois dans ces souris. Etant donné la nature majoritairement microgliale de ces marqueurs, nous avons étudié l'état d'activation de la microglie par immunohistochimie en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Iba1. Ce marquage apparaît plus important dans les souris A_{2A}R_{Astr} et Tau/A_{2A}R_{Astr}, suggérant un changement phénotypique de ces cellules microgliales en lien avec la surexpression du A_{2A}R astrocytaire (Figure 79B).

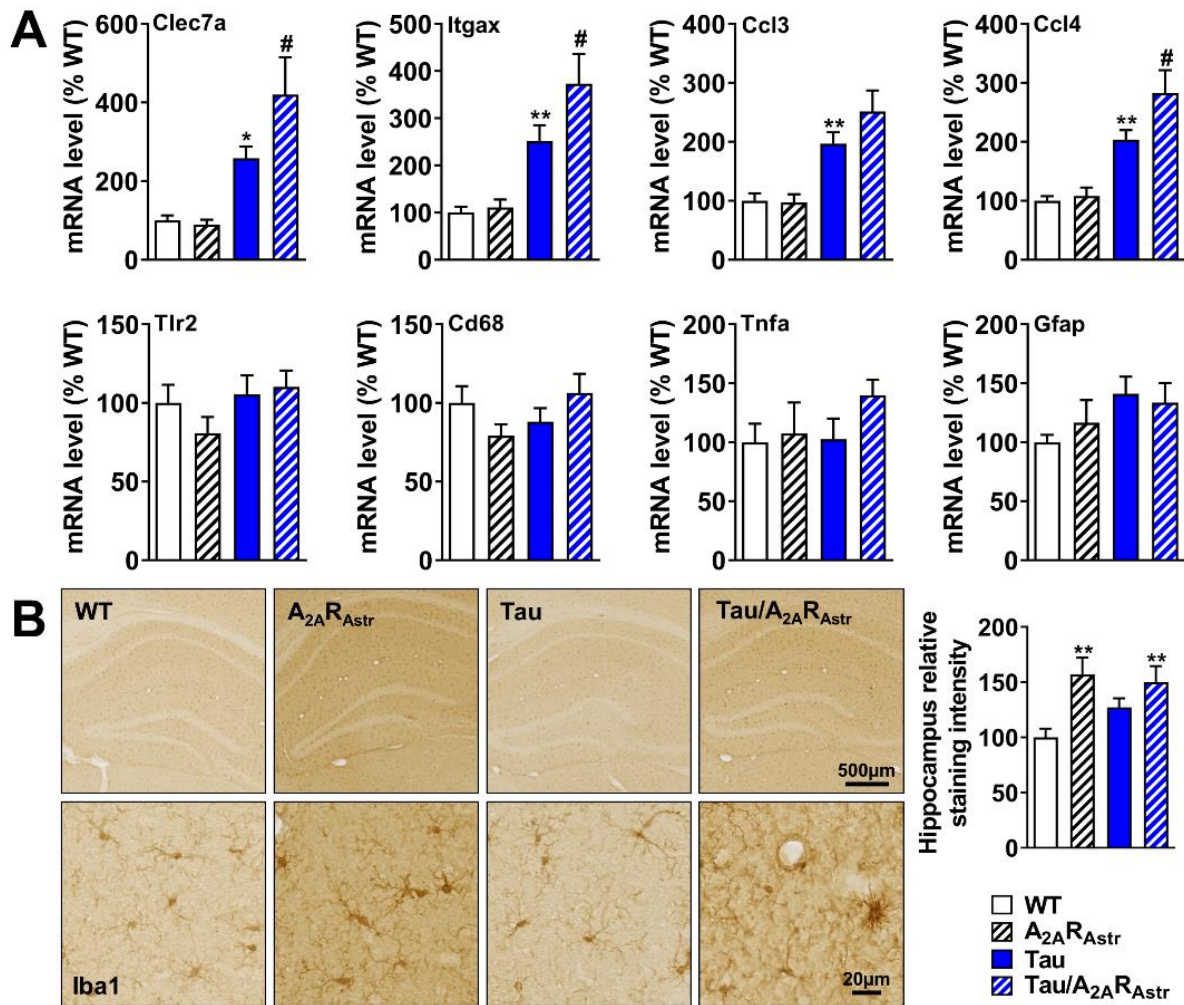


Figure 79 : Neuro-inflammation classique des souris Tau. Evaluation des marqueurs inflammatoires classiquement retrouvés augmentés dans les souris THY-Tau22 (Laurent *et al.*, 2017) par qPCR. N = 6-11 par groupe. **(B)** Images représentatives d'un marquage anti-Iba1 dans les quatre groupes expérimentaux par immunohistochimie. La quantification du marquage a montré une augmentation d'Iba1 dans les deux groupes A_{2A}R_{Astr} et Tau/A_{2A}R_{Astr}. N = 8-11 par groupe. *p<0,05, **p<0,01 vs. WT, #p<0,05 vs Tau en utilisant le test One-Way ANOVA suivi d'un test *post-test* LSD de Fisher. Les résultats sont exprimés en moy ± sem.

5. Conclusion

Grâce à cette étude préliminaire, nous avons tenté de comprendre l'influence de l'augmentation astrocytaire du A_{2A}R dans les astrocytes de souris développant une pathologie tau progressive associé à des déficits mnésiques. Nous avons montré que la surexpression astrocytaire du A_{2A}R favorise l'hyperphosphorylation de tau. Cet effet est associé à une aggravation des déficits mnésiques des souris Tau ainsi qu'à une exacerbation du phénotype inflammatoire. Le mécanisme par lequel le A_{2A}R astrocytaire est en mesure d'aggraver ces différents aspects n'est pas encore déterminé. Notre hypothèse principal repose sur son rôle de contrôle de la recapture de glutamate (Matos *et al.*, 2012a, 2013). Afin d'explorer cette piste, nous allons réaliser une microdialyse afin de déterminer le contenu en glutamate et GABA dans le parenchyme cérébral. Par ailleurs, les conséquences de cette surexpression astrocytaire sont bien distinctes de celles de la surexpression neuronale dans le contexte tau. Ces résultats renforcent l'intérêt thérapeutique du A_{2A}R dans le contexte des tauopathies.

DISCUSSION

1. Expression du A_{2A}R dans la maladie d'Alzheimer

L'augmentation des récepteurs A_{2A} dans les tauopathies a été observée pour la première fois dans l'étude d'Albasanz *et al.*, mettant en évidence une augmentation protéique du A_{2A}R dans le cortex frontal de patients atteints de la maladie de Pick (Albasanz *et al.*, 2006) puis dans la maladie d'Alzheimer (Albasanz *et al.*, 2008). Plus récemment, l'accumulation neuronale et synaptique des récepteurs A_{2A}R a été observée au cours du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer (Temido-Ferreira *et al.*, 2018), ainsi que dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Viana da Silva *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018). D'une part, une corrélation a été démontrée entre l'augmentation de l'expression du A_{2A}R hippocampique, la progression de la pathologie tau et, *in fine*, l'apparition des troubles cognitifs dans la maladie d'Alzheimer (Orr *et al.*, 2015), supportant un rôle instrumental potentiel du A_{2A}R dans l'évolution de cette maladie. D'autre part, une augmentation du A_{2A}R astrocytaire a été récemment observé au cours de la maladie d'Alzheimer (Orr *et al.*, 2015), mais aussi dans des modèles d'amyloïdogénèse (Orr *et al.*, 2015, 2018; Faivre *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018) et de lésions cérébrales traumatiques (Zhao *et al.*, 2017a, 2017b). L'augmentation de l'expression du A_{2A}R neuronal a, elle, été montrée au cours du vieillissement (Temido-Ferreira *et al.*, 2018), de l'épilepsie (Canas *et al.*, 2018) et de la maladie d'Alzheimer (Viana da Silva *et al.*, 2016; Temido-Ferreira *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Le doute subsiste quant au mécanisme à l'origine de cette augmentation d'expression, tant au niveau neuronal qu'astrocytaire.

2. Impact astrocytaire et neuronale du A_{2A}R dans la maladie d'Alzheimer

Dans ce travail de thèse, nous avons évalué les niveaux de récepteurs A_{2A} dans une tauopathie primaire, la dégénérescence lobaire frontotemporale, une démence caractérisée par la présence de protéines tau agrégées, associée à une mutation P301L de tau (FTLD-tau). Nous avons montré, pour la première fois, une accumulation de récepteurs A_{2A}R, particulièrement importante dans les neurones présentant la pathologie tau. Pour étudier la relation entre A_{2A}R et tau, nous avons généré un modèle de surexpression conditionnelle du A_{2A}R sous promoteur neuronal, que nous avons ensuite croisé avec un modèle de pathologie tau. Nous avons ainsi obtenu des souris présentant à la fois la pathologie tau et surexprimant le A_{2A}R au niveau neuronal (souris Tau/A_{2A}R_{Neur}). Ces animaux présentent une exacerbation des troubles mnésiques par rapport aux souris Tau, associé à une augmentation de la

phosphorylation de tau, des niveaux de la protéine du complément C1q, et à une perte de synapses glutamatergiques au sein de l'hippocampe. De plus, nous avons également exploré l'expression de C1q dans les cas de FTLD-tau ainsi que deux autres FTLD-tau – cette fois sans mutation – à savoir la dégénérescence cortico-basale et la maladie de Pick, où nous retrouvons également une augmentation de l'expression du A_{2A}R et de C1q. Conformément à ce que nous avons vu au cours de ces travaux, l'accentuation des niveaux du A_{2A}R neuronal apparaissent dans plusieurs maladies présentant de la pathologie tau. Cela favoriserait expérimentalement la production de C1q, mis en cause dans la perte synaptique médiée par la microglie et génératrice de déficits cognitifs (Stephan *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2016). Qui plus est, nous avons induit la surexpression neuronale du A_{2A}R dans un modèle d'amyloïdogénèse, récapitulant le deuxième aspect lésionnel de la maladie d'Alzheimer. Dans ce modèle, APP/PS1/A_{2A}R_{Neur}, nous avons également observé une précipitation des troubles cognitifs par rapport aux souris APP/PS1. Néanmoins, le mécanisme sous-jacent du phénotype mnésique observé semble différer de celui du modèle THY-Tau22, avec une perte de protéines synaptiques, sans modification transcriptomique ni d'augmentation de protéines C1q. Nous sommes encore pour l'heure à explorer les possibles causes de ce phénotype.

Relativement au rôle du récepteur A_{2A} astrocytaire dans la maladie d'Alzheimer, nous avons tout d'abord exploré, *in vitro*, les conséquences de sa surexpression dans des astrocytes issus de culture primaire de souris. Ce travail a révélé que le A_{2A}R induit un remaniement du transcriptome astrocytaire, affectant l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la sécrétion et l'inflammation. De surcroît, le blocage pharmacologique du A_{2A}R permet de restaurer l'expression d'une partie des gènes altérés jusqu'à leur niveau d'expression basale, témoignant du potentiel thérapeutique de ce récepteur. A l'instar du modèle Tau/A_{2A}R_{Neur}, nous avons généré des souris surexprimant le A_{2A}R sous promoteur astrocytaire, que nous avons également croisées avec les souris Tau. Ces souris Tau/A_{2A}R_{Astr} présentent à la fois la pathologie tau et la surexpression astrocytaire du A_{2A}R. De façon similaire, le A_{2A}R astrocytaire accélère l'apparition de troubles cognitifs chez la souris Tau, via à une augmentation de la phosphorylation et de l'agrégation de tau, ainsi qu'à l'exacerbation de la neuro-inflammation médiée par tau. Afin d'aller plus loin dans l'exploration du rôle du A_{2A}R astrocytaire dans le contexte Tau, nous avons développé une approche virale au moyen de virus adéno-associés (AAV), nous permettant d'exprimer le A_{2A}R spécifiquement au niveau des astrocytes de l'hippocampe. Ainsi, ce modèle nous permettra d'induire spécifiquement la surexpression astrocytaire du A_{2A}R au niveau de l'hippocampe de souris Tau mais également de souris APP/PS1. Nous mettrons également en œuvres d'autres techniques, comme la

microdialyse et le tri cellulaire, afin de réaliser une évaluation transcriptomique et fonctionnelle plus poussée.

3. A_{2A}R et fonction synaptique

Depuis qu'il a été mis en évidence un effet bénéfique de la caféine vis-à-vis du développement de la maladie d'Alzheimer (Eskelinen & Kivipelto, 2010; Cellai *et al.*, 2018), une accumulation de données tend à incriminer le récepteur A_{2A}R dans l'apparition des troubles cognitifs et des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Récemment, les travaux d'Orr *et al.* (2015), ont démontré un lien entre l'expression hippocampique du A_{2A}R au cours de la maladie d'Alzheimer et la progression spatio-temporelle stéréotypée de la pathologie tau dans le cerveau, elle-même corrélée l'évolution du déclin cognitif. Afin de mieux comprendre cette relation, nous avons, au cours de ces travaux de thèse, exploré le rôle d'une surexpression du récepteur A_{2A}, neuronale ou astrocytaire, dans plusieurs modèles expérimentaux afin de mieux comprendre son impact.

Nous avons constaté dans l'ensemble de nos modèles de surexpression neuronal ou astrocytaire du A_{2A}R un effet néfaste sur les capacités mnésiques chez les souris contrôles, sans toutefois induire de modifications pathologiques. Cela suggère des remaniements synaptiques suffisants pour altérer le bon fonctionnement du réseau neuronal hippocampique et induire des altérations comportementales. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature. Par exemple, les travaux de Temido-Ferreira *et al.*, démontrent que la surexpression neuronale du A_{2A}R, seule, induit un phénotype mnésique associé à des modifications de plasticité synaptique, lié à la signalisation des récepteurs glutamatergiques NMDA et mGLUR5 (Temido-Ferreira *et al.*, 2018). A cet égard, au niveau neuronal, le A_{2A}R favorise d'une part la libération de neurotransmetteur, majoritairement du glutamate, depuis l'extrémité présynaptique, tout en favorisant l'excitabilité des récepteurs post-synaptiques comme les récepteurs au glutamate. D'autre part, il va également inhiber les systèmes inhibiteurs de l'activation de la synapse, comme les récepteurs à l'adénosine A1 et cannabinoïdes CB1, par hétérodimérisation.

Dans le même ordre d'idée, le A_{2A}R astrocytaire, dont le blocage est bénéfique vis-à-vis des troubles mnésiques (Orr *et al.*, 2015), module particulièrement la recapture du glutamate, à la fois via son contrôle direct sur la pompe sodium-potassium Na⁺/K⁺ ATPase, essentielle au fonctionnement des transporteurs de glutamate GLT-1 et GLAST (Matos *et al.*, 2012a, 2013). Le A_{2A}R astrocytaire semble également en mesure de modifier la transduction

glutamatergique, de la libération présynaptique à l'excitabilité post-synaptique (Matos *et al.*, 2015).

Par conséquent, il est possible que la surexpression du A_{2A}R dans nos modèles, dans l'un ou l'autre des types cellulaires, favorise l'augmentation du glutamate synaptique et de sa signalisation, via les transporteurs de glutamate astrocytaires ou la libération de glutamates présynaptiques et d'excitabilité des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques, impactant potentiellement les phénomènes de plasticité synaptique. Une augmentation de glutamate peut, en somme, contribuer à l'évolution de la neuroinflammation et de l'hyperphosphorylation de tau qui serait déjà présente dans le modèle.

Il est intéressant de noter que dans les modèles de la maladie d'Alzheimer, le récepteur purinergique P2Y1 induit une hyperactivation des astrocytes, favorisant la génération de vagues calciques astrocytaire. A la manière du A_{2A}R, P2Y1 est activé par un produit issu de la dégradation de l'ATP : l'ADP. Par ailleurs, des travaux ont montré que ces deux récepteurs, A_{2A}R et P2Y1, étaient en mesure d'activer la signalisation calcique astrocytaire, conduisant à la libération de gliotransmetteurs comme l'ATP et le glutamate (Doengi *et al.*, 2008; Delekate *et al.*, 2014; Cervetto *et al.*, 2017), permettant hypothétiquement d'entretenir une boucle de rétroaction positive pour ces deux récepteurs via le clivage de l'ATP. Par ailleurs, cela s'ajoute à l'augmentation d'expression des enzymes responsables de l'hydrolyse de l'ATP et de la production de l'adénosine, tels que CD39 et CD73, (Crooke *et al.*, 2017; Alonso-Andrés *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2019a). A l'égard à ce qui précède, il serait donc important de mesurer les niveaux de glutamate, d'adénosine et autres gliotransmetteurs par microdialyse afin de vérifier si, effectivement, les conséquences d'une surexpression du A_{2A}R favorisent une augmentation notable et durable des niveaux de glutamate extracellulaire ainsi qu'une activation chronique délétère des récepteurs purinergiques.

4. A_{2A}R et pathologie tau

Les travaux réalisés au sein du laboratoire ont démontré que le blocage du A_{2A}R, de façon non sélective (par la caféine) ou sélective (par des approches pharmacologiques ou de délétion génétique), étaient en mesure de ralentir le développement de la pathologie tau (Laurent *et al.*, 2014, 2016). Les principaux effets de la caféine sur tau ont démontré, d'une part, une réduction de la phosphorylation des épitopes Ser195/198/199/202 (Tau-1), Ser212/Thr214, Ser396, Ser422. Ces effets ont été attribués à l'augmentation d'expression de la phosphatase PP2A (protéine phosphatase 2). D'autre part, la délétion génétique du A_{2A}R réduit la

phosphorylation globale de tau, avec une diminution significative de l'épitope phosphorylé Ser214 et une tendance sur les épitopes Thr181 et Ser404. Dans ce cas, l'inhibition de la GSK3 via l'augmentation de la phosphorylation de la Ser9, ainsi qu'une diminution de l'expression de CDK5, ont été incriminés. Par ailleurs, le blocage pharmacologique par le MSX-3 conduit également à une diminution de phosphorylation globale de tau, avec une diminution significative des épitopes phosphorylés Ser214, Ser262 et Ser404. Ces différents résultats suggèrent que le blocage des récepteurs adénosinergiques (par la caféine) ou le blocage sélectif du A_{2A}R conduit à une réduction de la phosphorylation et/ou de l'agrégation de tau (objectivé par les épitopes pathologiques Ser212/Thr214 et Ser422).

Au vu de nos résultats, nous pouvons confirmer que la dysrégulation du A_{2A}R, tant au niveau neuronal qu'au niveau astrocytaire, impacte significativement la phosphorylation et l'agrégation de tau. En outre, dans notre modèle Tau/A_{2A}R_{Neur}, nous montrons une augmentation globale de phosphorylation, objectivé sur les sites Ser195/198/199/202 et Ser396. De façon consistante, nous observons également dans le modèle Tau/A_{2A}R_{Astr} une augmentation de phosphorylation globale de tau, particulièrement sur les sites Thr212/Ser214, Ser396, Ser404, Ser422, associée à une augmentation d'agrégation de tau, démontrée par le marquage MC1. Par ailleurs, ces résultats concordent avec ceux obtenus dans un modèle de lésions cérébrales traumatiques, qui est également une tauopathie. En effet, dans ce modèle il y a rapidement une augmentation du A_{2A}R astrocytaire associée à une hyperphosphorylation de tau et des troubles cognitifs. Le blocage du A_{2A}R permet de normaliser à la fois la phosphorylation de tau et les troubles cognitifs (Zhao *et al.*, 2017a, 2017b). De ces différentes études, nous pouvons affirmer que le A_{2A}R joue un rôle sur la phosphorylation et potentiellement l'agrégation de tau, renforçant l'intérêt thérapeutique du A_{2A}R vis-à-vis des tauopathies.

5. A_{2A}R et pathologie amyloïde

Du reste, il est rapporté dans la littérature que les récepteurs adénosinergiques modulent la production de peptides A β dans les modèles amyloïdes (Arendash *et al.*, 2006, 2009; Nagpure & Bian, 2014). Toutefois, l'impact du A_{2A}R sur l'amyloïdogénèse semble être plus subtile à évaluer dans le modèle que nous avons utilisé, la souris APP/PS1. En effet, celle-ci surexprime à la fois une protéine APP mutée, orientant vers la voie amyloïdogénique, et une protéine PS1, dont l'exon 9 a été supprimé, favorisant ainsi l'accumulation de formes pro-agrégatives de peptides amyloïdes A β . Ces deux protéines surexprimées vont pousser la voie

amyloïdogénique à son paroxysme, ce qui n'est pas idéal pour visualiser un potentiel effet aggravateur du A_{2A}R sur cette voie. Ainsi, nous n'avons pas observé de modification significative, tant bien sur la quantité des différentes espèces de peptides amyloïdes A β que sur le nombre de plaques, bien que cela ait été démontré *in vitro* (Cao *et al.*, 2011). Une récente étude a également montré par simulations que la caféine pouvait reconnaître le motif impliqué dans la formation des assemblages des peptide A β (A β ₁₆₋₂₂), bloquant ainsi la génération d'agrégats. Cela pourrait expliquer les effets bénéfiques de la caféine sans passer par le blocage des récepteurs à l'adénosine (Sharma & Paul, 2016). En outre, les précédents travaux de notre groupe ont démontré que le blocage pharmacologique du A_{2A}R diminuait les niveaux des peptides A β ₁₋₄₂ entraînant une diminution du nombre de petites plaques amyloïdes dans le cortex de ce même modèle APP/PS1 (Faivre *et al.*, 2018).

Cela suggère que le A_{2A}R, tant neuronal qu'astrocytaire, pourrait moduler le clivage de l'APP ou de ses dérivés, et ainsi moduler leurs agrégations sous forme de plaques. Par ailleurs, des études (Viana da Silva *et al.*, 2016; Orr *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Faivre *et al.*, 2018) montrent que le A_{2A}R a un effet délétère sur la mémoire de ces souris, si bien qu'il soit possible que le A_{2A}R contribuerait à exacerber la toxicité synaptique du peptide amyloïde, précédemment rapporté dans la littérature (Dall'Igna *et al.*, 2003, 2007; Cunha *et al.*, 2008; Canas *et al.*, 2009a; Matos *et al.*, 2012b), pouvant expliquer ainsi les altérations mnésiques dans ces différents modèles. Cette hypothèse est également supportée par l'altération importante de protéines synaptiques dans notre modèle, sans modification de leur expression génique.

6. A_{2A}R neuronal et C1q

Dans notre étude sur la surexpression neuronale du A_{2A}R dans les souris Tau, nous avons mis en évidence une augmentation des ARNm et des protéines du complément C1q. Ce dernier est l'initiateur de la voie classique du complément, pouvant ainsi reconnaître un pathogène ou fixer des anticorps via leurs régions Fc. La liaison du C1q à sa cible déclenche le recrutement et le clivage des protéines C2 et C4 afin de former un complexe C3 convertase, clivant la protéine C3 en C3a et C3b. Le C3b permet l'opsonisation, c'est-à-dire de marquer la cible afin que celle-ci soit reconnue par les cellules immunitaires et éliminée par phagocytose. Le C3a va lui migrer à distance et attirer de cellules immunitaires. Lorsque la cascade du complément perdure, la C3b au niveau de la cible va recruter le complexe C4b/C2a afin de créer la C5 convertase, qui va à son tour, cliver la protéine C5. Elle va permettre grâce au

DISCUSSION

recrutement d'autres protéines du complément, la formation d'un complexe d'attaque membranaire au niveau de la membrane de la cible, résultant en sa destruction (Merle *et al.*, 2015a, 2015b).

Dans le cerveau, qui est une région immunitaire protégée, C1q est presque uniquement exprimé par les microglies (Fonseca *et al.*, 2017), et est particulièrement actif au cours de la période de développement, où ce dernier va contribuer à affiner le réseau de synapses en élaguant les synapses surnuméraires. Ce système va progressivement s'éteindre jusqu'à l'âge adulte (Coulthard *et al.*, 2018). Toutefois, dans de nombreuses situations, une réactivation de ce système a été décrite, avec une augmentation de protéines C1q lors d'infections virales (Vasek *et al.*, 2016), durant le vieillissement (Stephan *et al.*, 2013) ainsi que dans la maladie d'Alzheimer (Fonseca, 2004; Hong *et al.*, 2016; Dejanovic *et al.*, 2018). Des troubles de la cognition ont été mis en évidence dans ces différentes situations, également en lien avec une perte synaptique médiée par C1q. De surcroît, le blocage du C1q au cours du vieillissement ou dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer permet de préserver les capacités mnésiques (Stephan *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2016). Il est particulièrement intéressant de noter que le C1q semble être activé en réponse à la pathologie tau (Afagh *et al.*, 1996; Dejanovic *et al.*, 2018), ce qui est également confirmé dans le modèle THY-Tau22, qui à l'âge de 9 mois présente une perte synaptique (Burlot *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2018) associée à une augmentation des niveaux de C1q.

Il semblerait ainsi que le A_{2A}R neuronal, possiblement via l'augmentation de la phosphorylation de tau, ait précipité l'augmentation d'expression de C1q à un âge plus précoce de 6 mois dans ce même modèle. De façon encourageante, le blocage pharmacologique du A_{2A}R chez des souris Tau de 9 mois, âge où ces dernières présentent également une perte de densité synaptique (Burlot *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2018), permet de normaliser C1q au niveau des souris contrôles, suggérant que le A_{2A}R interfère également dans la réponse du C1q vis-à-vis de la pathologie tau (Laurent *et al.*, 2016). Ainsi, le A_{2A}R semble être un élément déterminant dans le lien entre tau et C1q. A ce titre, on retrouve également dans les mêmes conditions, l'expression de Trem2, un marqueur découvert lors des études d'association pangénomique (GWAS, « genome wide association study »), et qui est également impliqué dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer (Guerreiro *et al.*, 2013; Bemiller *et al.*, 2017; Haure-Mirande *et al.*, 2017). Bien que sa relation avec la pathologie tau ne soit pas encore complètement élucidée, il semblerait que Trem2 soit requis pour l'élimination synaptique médiée par C1q (Brendel *et al.*, 2017; Filipello *et al.*, 2018).

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de modifications des niveaux de C1q dans notre modèle amyloïde APP/PS1 à l'âge de 6 mois, contrairement à ce qui a été montré dans un autre modèle plus agressif, les J20 âgées de 1 mois (Hong *et al.*, 2016). Dans ce contexte, les troubles mnésiques liés à la surexpression du A_{2A}R neuronal dans le modèle APP/PS1 n'impliqueraient pas C1q. En définitive, la pathologie tau semble favoriser l'accumulation de C1q de façon dépendante à A_{2A}R et contribuer à l'apparition de troubles cognitifs via une perte des synapses glutamatergiques. Dans cette optique, nous allons prochainement bloquer l'expression génique du A_{2A}R ou de C1q spécifiquement au niveau neuronal dans les souris THY-Tau22 afin d'évaluer si cela peut bloquer la progression de la pathologie tau et des déficits cognitifs associés.

7. A_{2A}R astrocytaire et neuro-inflammation

Le rôle du A_{2A}R au niveau astrocytaire est encore mal connu. Il est rapporté dans la littérature l'effet modulateur du A_{2A}R astrocytaire vis-à-vis de la cognition, en condition physiologique comme pathologique (Matos *et al.*, 2015; Orr *et al.*, 2015; Barros-Barbosa *et al.*, 2016). Plusieurs fonctions astrocytaires du A_{2A}R ont été décrites, parmi lesquelles le contrôle de la recapture du glutamate et du GABA (Matos *et al.*, 2012a, 2013; Cristóvão-Ferreira *et al.*, 2013), la libération de gliotransmetteurs (Cervetto *et al.*, 2017), la prolifération induite par la voie NF-κB (Ke *et al.*, 2009), la production de monoxyde d'azote (NO) (Brodie *et al.*, 1998) et également la production et libération de cytokines pro-inflammatoires (Hohsfield & Humpel, 2015; Rothhammer & Quintana, 2015). Par ailleurs, notre étude *in vitro* démontre un effet transcriptionnel associé à l'activation de la signalisation du A_{2A}R. A cet égard, il est retrouvé l'augmentation des marqueurs de la réactivité astrocytaire associée à phénotype délétère (A1), protecteur (A2) ou mixte (« Pan réactive ») (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017). En outre, on retrouve, parmi les gènes les plus exprimés en réponse au A_{2A}R, différents gènes pro-inflammatoires, tels que Lcn2, Chi311 et Il1β, tous trois impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Naudé *et al.*, 2012; Heneka *et al.*, 2013; Querol-Vilaseca *et al.*, 2017; Dai & Gong, 2019). En revanche, nous observons également une sous-expression d'un grand nombre d'autres marqueurs inflammatoires, suggérant une hétérogénéité d'expression du A_{2A}R ou différents types de réponses médiées par A_{2A}R. L'existence d'un effet pro- ou anti-inflammatoire du A_{2A}R selon le contexte, notamment en fonction des niveaux de glutamate, avait déjà été suggéré, modifiant par la même occasion la signalisation de ce dernier, d'une voie PKA (protectrice) vers une voie PKC (délétère) (Dai *et al.*, 2010). Par

ailleurs, le gène dont l'expression est la plus augmentée est celui de la sécrétogranine II (Scg2), dont l'expression est sous dépendance de l'AMPc (Jones & Scammell, 1998; Iwase *et al.*, 2014), ce qui suggérerait, dans notre modèle, une réponse du A_{2A}R astrocytaire PKA-dépendante. Bien que la Scg2 soit principalement décrite dans les neurones de l'hippocampe, plusieurs études ont montré son expression dans des astrocytes, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Fischer-Colbrie *et al.*, 1993; Calegari *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 2011). En somme, ces résultats confortent le rôle modulateur de l'inflammation par le A_{2A}R (Minghetti *et al.*, 2007; Nobre *et al.*, 2010; Gyoneva *et al.*, 2014; Ogawa *et al.*, 2018). Conformément à ce qui précède, nous retrouvons également dans notre étude *in vivo*, un effet neuromodulateur de la surexpression astrocytaire du A_{2A}R chez les souris tau, principalement des marqueurs inflammatoires précédemment associés à la pathologie tau (Laurent *et al.*, 2017). Toutefois, la comparaison n'est pas aisée due à l'hétérogénéité cellulaire dans l'hippocampe. Afin d'identifier, précisément, les remaniements astrocytaires dans ce modèle, il faudrait réaliser un tri des astrocytes surexprimant le A_{2A}R et analyser leur transcriptome, afin de tester plusieurs des gènes retrouvés en conditions *in vitro*.

8. Conclusion

A la lumière de nos résultats et de la littérature, notre hypothèse est que les A_{2A}Rs seraient augmentés au niveau synaptique au cours du vieillissement, participant ainsi à l'apparition des troubles cognitifs liés à l'âge (Figure 80). Lors de la phase précoce de la maladie d'Alzheimer, l'augmentation neuronale du A_{2A}R serait plus importante et contribuerait au développement de la pathologie tau et des déficits de mémoire via une perte synaptique (Viana da Silva *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Temido-Ferreira *et al.*, 2018). Les A_{2A}Rs astrocytaires ne seraient augmentés que plus tardivement lorsque la pathologie est déjà installée, renforçant probablement les processus pathologiques (Figure 80) (Orr *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018; Faivre *et al.*, 2018).

En définitive, ces travaux de thèse renforcent l'idée que la dysrégulation des A_{2A}R, au cours du vieillissement, de la maladie d'Alzheimer, mais également d'autres pathologies telles que les tauopathies, contribuerait à favoriser le développement pathologique et l'apparition de troubles cognitifs. Il serait intéressant à l'avenir d'étudier plus précisément si le A_{2A}R est également perturbé dans les cellules microgliales (Orr *et al.*, 2009; Rebola *et al.*, 2011; Boia *et al.*, 2017), les oligodendrocytes (Coppi *et al.*, 2013; De Nuccio *et al.*, 2019) et les cellules endothéliales au cours de la maladie d'Alzheimer (Hurtado-Alvarado *et al.*, 2016; Liu *et al.*,

2018b). Enfin, il faudra également à l'avenir tenir compte des autres acteurs du système purinergique, comme les enzymes de production de l'adénosine et les autres récepteurs purinergiques, qui sont aussi dérégulés dans la maladie d'Alzheimer, comme P2X7, impliqué dans l'état pro-inflammatoire microglial (Martin *et al.*, 2019), ou P2Y1, essentiel à l'activation astrocytaire (Delekate *et al.*, 2014; Reichenbach *et al.*, 2018).

En conclusion, le blocage du A_{2A}R, de manière sélective par une approche pharmacologique, ou non sélective par la caféine, constituerait une nouvelle piste intéressante et novatrice dans le traitement des maladies neurodégénératives. Le développement d'approches thérapeutiques permettant de normaliser ce système purinergique, dans sa globalité, pourrait permettre de freiner voire stopper la progression inéluctable de ces maladies.

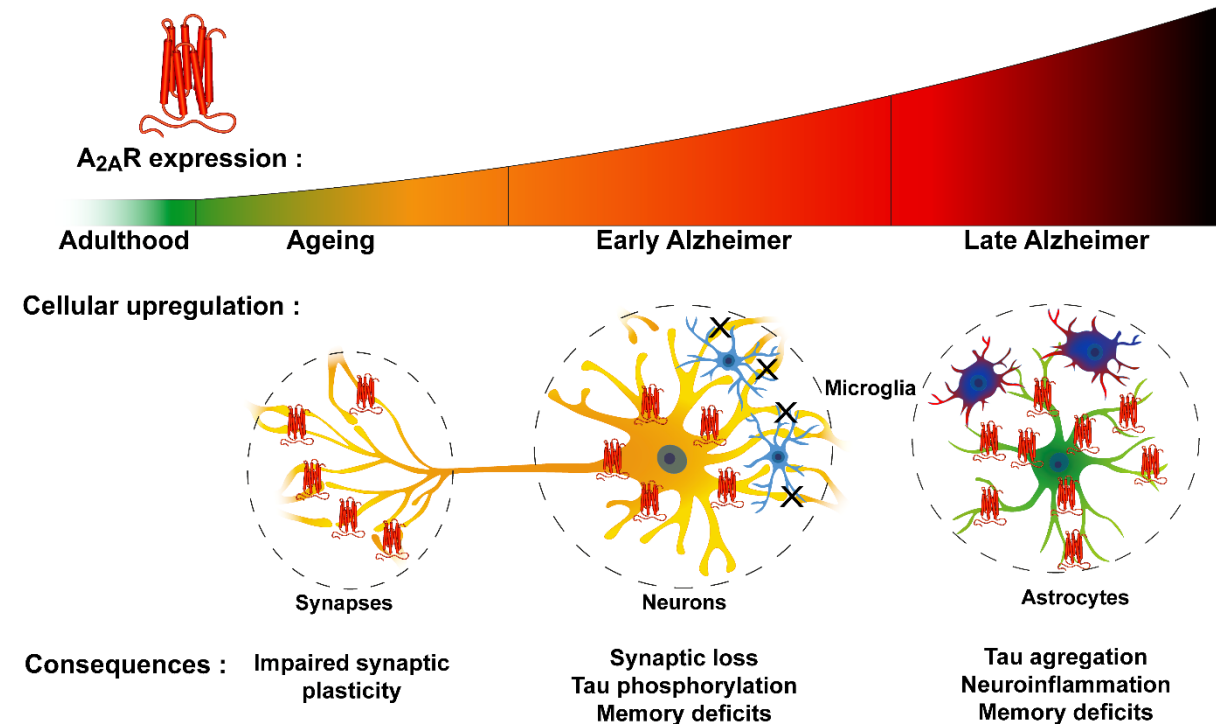


Figure 80 : Hypothèse de la dysrégulation du A_{2A}R au cours du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer. Le A_{2A}R est faiblement exprimé en condition physiologique à l'âge adulte dans l'hippocampe, une des régions du cerveau la plus touchée lors de l'installation de la maladie d'Alzheimer. Au cours du vieillissement, le A_{2A}R est augmenté dans cet hippocampe en premier lieu dans les synapses. Lors du début de la maladie d'Alzheimer, le A_{2A}R augmente ainsi dans les neurones puis dans la deuxième moitié de la maladie, il est également augmenté dans les astrocytes. Aux vues des résultats présentés dans ce travail de thèse ainsi que dans la littérature on peut formuler l'hypothèse que le A_{2A}R synaptique contribue aux déficits précoces de plasticité synaptique, puis l'augmentation neuronale favorise l'hyperphosphorylation de tau ainsi que l'élimination synaptique induite par la microglie. Enfin, le A_{2A}R astrocytaire accentuerait les troubles mnésiques et favoriserait l'agrégation de tau et la neuro-inflammation. Ainsi, le A_{2A}R serait un acteur à part entière de la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* *64*, 445–475.

Abraham, W.C., Christie, B.R., Logan, B., Lawlor, P., and Dragunow, M. (1994). Immediate early gene expression associated with the persistence of heterosynaptic long-term depression in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 10049–10053.

Abraham, W.C., Logan, B., Greenwood, J.M., and Dragunow, M. (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J. Neurosci.* *22*, 9626–9634.

Abramov, O., and Mojzsis, S.J. (2009). Microbial habitability of the Hadean Earth during the late heavy bombardment. *Nature* *459*, 419–422.

Afagh, A., Cummings, B.J., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Tenner, A.J. (1996). Localization and Cell Association of C1q in Alzheimer's Disease Brain. *Experimental Neurology* *138*, 22–32.

Alafuzoff, I., Iqbal, K., Friden, H., Adolfsson, R., and Winblad, B. (1987). Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta Neuropathologica* *74*, 209–225.

Albasanz, J.L., Rodríguez, A., Ferrer, I., and Martín, M. (2006). Adenosine A2A receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol.* *16*, 249–255.

Albasanz, J.L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I., and Martín, M. (2008). Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* *18*, 211–219.

Alford, S., Patel, D., Perakakis, N., and Mantzoros, C.S. (2018). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obesity Reviews* *19*, 269–280.

Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *117*, 145–152.

Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 6923–6928.

Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature Medicine* *2*, 783–787.

Alonso, A.D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C.P., Alaniz, M.E., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry* 285, 30851–30860.

Alonso-Andrés, P., Albasanz, J.L., Ferrer, I., and Martín, M. (2018). Purine-related metabolites and their converting enzymes are altered in frontal, parietal and temporal cortex at early stages of Alzheimer's disease pathology: Purine-related Metabolites and their Converting Enzymes in AD. *Brain Pathology* 28, 933–946.

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, R106.

Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.

Anderson, J.P., Esch, F.S., Keim, P.S., Sambamurti, K., Lieberburg, I., and Robakis, N.K. (1991). Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci. Lett.* 128, 126–128.

Andrew, R.J., Kellett, K.A.B., Thinakaran, G., and Hooper, N.M. (2016). A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J Biol Chem* 291, 19235–19244.

Annaert, W., and De Strooper, B. (2010). Alzheimer's disease neurons fail the acid test. *Cell* 141, 1112–1114.

Arendash, G.W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E.K., Zacharia, L.C., Cracchiolo, J.R., Shippy, D., and Tan, J. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142, 941–952.

Arendash, G.W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Rezai-Zadeh, K., Tan, J., Citron, B.A., Lin, X., et al. (2009). Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid- β Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Alzheimer's Disease* 17, 661–680.

Arendt, T., Stieler, J., and Holzer, M. (2015). Brain hypometabolism triggers PHF-like phosphorylation of tau, a major hallmark of Alzheimer's disease pathology. *Journal of Neural Transmission* 122, 531–539.

Aridi, Y.S., Walker, J.L., and Wright, O.R.L. (2017). The Association between the Mediterranean Dietary Pattern and Cognitive Health: A Systematic Review. *Nutrients* 9.

Arioka, M., Tsukamoto, M., Ishiguro, K., Kato, R., Sato, K., Imahori, K., and Uchida, T. (1993). Tau protein kinase II is involved in the regulation of the normal phosphorylation state of tau protein. *J. Neurochem.* 60, 461–468.

Arnold, C.S., Johnson, G.V., Cole, R.N., Dong, D.L., Lee, M., and Hart, G.W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271, 28741–28744.

Arranz, A.M., and De Strooper, B. (2019). The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol* 18, 406–414.

Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631–639.

Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kügler, S., and Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature Neuroscience* 18, 1584–1593.

Asphaug, E. (2014). Impact Origin of the Moon? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 42, 551–578.

Atef, R.M., Agha, A.M., Abdel-Rhman, A.-R.A., and Nassar, N.N. (2018). The Ying and Yang of Adenosine A1 and A2A Receptors on ERK1/2 Activation in a Rat Model of Global Cerebral Ischemia Reperfusion Injury. *Mol. Neurobiol.* 55, 1284–1298.

Augusto, E., Matos, M., Sévigny, J., El-Tayeb, A., Bynoe, M.S., Müller, C.E., Cunha, R.A., and Chen, J.-F. (2013). Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Formation of Adenosine Is Critical for the Striatal Adenosine A2A Receptor Functions. *J Neurosci* 33, 11390–11399.

Ayers, J.I., Giasson, B.I., and Borchelt, D.R. (2018). Prion-like Spreading in Tauopathies. *Biol. Psychiatry* 83, 337–346.

B

Babskii, E.B., and Malkiman, I.I. (1950). Effect of adenosine-triphosphoric acid on the chronaxy of the motor zone of the cerebral cortex. *C R Acad Sci USSR* 74, 1135–1137.

Baek, H., Ye, M., Kang, G.-H., Lee, C., Lee, G., Choi, D.B., Jung, J., Kim, H., Lee, S., Kim, J.S., et al. (2016). Neuroprotective effects of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in a 3xTg-AD Alzheimer's disease model. *Oncotarget* 7, 69347–69357.

Baeta-Corral, R., Johansson, B., and Giménez-Llort, L. (2018). Long-term Treatment with Low-Dose Caffeine Worsens BPSD-Like Profile in 3xTg-AD Mice Model of Alzheimer's Disease and Affects Mice with Normal Aging. *Front Pharmacol* 9, 79.

Bai, G., Gazdik, M.A., Schaak, D.D., and McDonough, K.A. (2007). The Mycobacterium bovis BCG cyclic AMP receptor-like protein is a functional DNA binding protein in vitro and in vivo, but its activity differs from that of its M. tuberculosis ortholog, Rv3676. *Infect. Immun.* 75, 5509–5517.

Bak, M.I., and Ingwall, J.S. (1998). Regulation of cardiac AMP-specific 5'-nucleotidase during ischemia mediates ATP resynthesis on reflow. *Am. J. Physiol.* 274, C992-1001.

Balducci, C., Santamaria, G., La Vitola, P., Brandi, E., Grandi, F., Viscomi, A.R., Beeg, M., Gobbi, M., Salmona, M., Ottonello, S., et al. (2018). Doxycycline counteracts neuroinflammation restoring memory in Alzheimer's disease mouse models. *Neurobiology of Aging* 70, 128–139.

Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y.M., King, A.E., Cass, C.E., and Young, J.D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflügers Arch.* 447, 735–743.

- Ballard, F.J. (1970). Adenine nucleotides and the adenylate kinase equilibrium in livers of foetal and newborn rats. *Biochem. J.* *117*, 231–235.
- Bara-Jimenez, W., Sherzai, A., Dimitrova, T., Favit, A., Bibbiani, F., Gillespie, M., Morris, M.J., Mouradian, M.M., and Chase, T.N. (2003). Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* *61*, 293–296.
- Baranello, R.J., Bharani, K.L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D.K., Greig, N.H., Pappolla, M.A., and Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* *12*, 32–46.
- Baron, L., Gombault, A., Fanny, M., Villeret, B., Savigny, F., Guillou, N., Panek, C., Le Bert, M., Lagente, V., Rassendren, F., et al. (2015). The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis* *6*, e1629–e1629.
- Baron, R., Babcock, A.A., Nemirovsky, A., Finsen, B., and Monsonogo, A. (2014). Accelerated microglial pathology is associated with A β plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* *13*, 584–595.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., and Soderling, T.R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* *276*, 2042–2045.
- Barrie, A.P., and Nicholls, D.G. (1993). Adenosine A1 receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *J. Neurochem.* *60*, 1081–1086.
- Barros-Barbosa, A.R., Ferreirinha, F., Oliveira, Â., Mendes, M., Lobo, M.G., Santos, A., Rangel, R., Pelletier, J., Sévigny, J., Cordeiro, J.M., et al. (2016). Adenosine A2A receptor and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are upregulated in hippocampal astrocytes of human patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). *Purinergic Signalling* *12*, 719–734.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* *524*, 3865–3895.
- Basurto-Islas, G., Blanchard, J., Tung, Y.C., Fernandez, J.R., Voronkov, M., Stock, M., Zhang, S., Stock, J.B., and Iqbal, K. (2014). Therapeutic benefits of a component of coffee in a rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* *35*, 2701–2712.
- Batalha, V.L., Pego, J.M., Fontinha, B.M., Costenla, A.R., Valadas, J.S., Baqi, Y., Radjainia, H., Müller, C.E., Sebastião, A.M., and Lopes, L.V. (2013). Adenosine A2A receptor blockade reverts hippocampal stress-induced deficits and restores corticosterone circadian oscillation. *Molecular Psychiatry* *18*, 320–331.
- Batalha, V.L., Ferreira, D.G., Coelho, J.E., Valadas, J.S., Gomes, R., Temido-Ferreira, M., Schmidt, T., Baqi, Y., Buée, L., Müller, C.E., et al. (2016). The caffeine-binding adenosine A2A receptor induces age-like HPA-axis dysfunction by targeting glucocorticoid receptor function. *Scientific Reports* *6*.
- Baudier, J., and Cole, R.D. (1988). Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* *263*, 5876–5883.

- Bazargani, N., and Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat. Neurosci.* *19*, 182–189.
- Beggiato, S., Tomasini, M.C., Borelli, A.C., Borroto-Escuela, D.O., Fuxe, K., Antonelli, T., Tanganelli, S., and Ferraro, L. (2016). Functional role of striatal A2A, D2, and mGlu5 receptor interactions in regulating striatopallidal GABA neuronal transmission. *J. Neurochem.* *138*, 254–264.
- Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* *14*, 724–738.
- Belarbi, K., Schindowski, K., Burnouf, S., Caillierez, R., Grosjean, M.-E., Demeyer, D., Hamdane, M., Sergeant, N., Blum, D., and Buee, L. (2009). Early Tau Pathology Involving the Septo-Hippocampal Pathway in a Tau Transgenic Model: Relevance to Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research* *6*, 152–157.
- Belarbi, K., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F.-J., Desmercieres, J., Troquier, L., Brouillette, J., Tsambou, L., Grosjean, M.-E., Caillierez, R., Demeyer, D., et al. (2011). Loss of Medial Septum Cholinergic Neurons in THY-Tau22 Mouse Model: What Links with tau Pathology? *Current Alzheimer Research* *8*, 633–638.
- Bell, E.A., Boehnke, P., Harrison, T.M., and Mao, W.L. (2015). Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon. *PNAS* *112*, 14518–14521.
- Bellucci, A., Westwood, A.J., Ingram, E., Casamenti, F., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2004). Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *Am J Pathol* *165*, 1643–1652.
- Bemiller, S.M., McCray, T.J., Allan, K., Formica, S.V., Xu, G., Wilson, G., Kokiko-Cochran, O.N., Crish, S.D., Lasagna-Reeves, C.A., Ransohoff, R.M., et al. (2017). TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy. *Molecular Neurodegeneration* *12*.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* *57*: 289–300.
- Bennecib, M., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2000). Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett.* *485*, 87–93.
- Benseny-Cases, N., Cócera, M., and Cladera, J. (2007). Conversion of non-fibrillar beta-sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *361*, 916–921.
- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O.N., Cardona, A., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2010). Regulation of Tau Pathology by the Microglial Fractalkine Receptor. *Neuron* *68*, 19–31.
- Biagini, G., D'Antuono, M., Benini, R., de Guzman, P., Longo, D., and Avoli, M. (2013). Perirhinal cortex and temporal lobe epilepsy. *Front Cell Neurosci* *7*, 130.

- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* *11*, 153–163.
- Bjorness, T.E., Kelly, C.L., Gao, T., Poffenberger, V., and Greene, R.W. (2009). Control and function of the homeostatic sleep response by adenosine A1 receptors. *J. Neurosci.* *29*, 1267–1276.
- Bjorness, T.E., Dale, N., Mettlach, G., Sonneborn, A., Sahin, B., Fienberg, A.A., Yanagisawa, M., Bibb, J.A., and Greene, R.W. (2016). An Adenosine-Mediated Glial-Neuronal Circuit for Homeostatic Sleep. *J. Neurosci.* *36*, 3709–3721.
- Blum, D., Gall, D., Galas, M.-C., d'Alcantara, P., Bantubungi, K., and Schiffmann, S.N. (2002). The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J. Neurosci.* *22*, 9122–9133.
- Blum, D., Hourez, R., Galas, M.C., Popoli, P., and Schiffmann, S.N. (2003). Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. *Lancet Neurol* *2*, 366–374.
- Blum, D., Chtarto, A., Tenenbaum, L., Brotchi, J., and Levivier, M. (2004). Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease* *17*, 359–366.
- Blum, D., Chern, Y., Domenici, M.R., Buée, L., Lin, C.-Y., Rea, W., Ferré, S., and Popoli, P. (2018). The Role of Adenosine Tone and Adenosine Receptors in Huntington's Disease. *Journal of Caffeine and Adenosine Research* *8*, 43–58.
- Boia, R., Elvas, F., Madeira, M.H., Aires, I.D., Rodrigues-Neves, A.C., Tralhão, P., Szabó, E.C., Baqi, Y., Müller, C.E., Tomé, Â.R., et al. (2017). Treatment with A2A receptor antagonist KW6002 and caffeine intake regulate microglia reactivity and protect retina against transient ischemic damage. *Cell Death Dis* *8*, e3065–e3065.
- Bolós, M., Llorens-Martín, M., Perea, J.R., Jurado-Arjona, J., Rábano, A., Hernández, F., and Avila, J. (2017). Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol Neurodegener* *12*, 59.
- Bonaventura, J., Navarro, G., Casadó-Anguera, V., Azdad, K., Rea, W., Moreno, E., Brugarolas, M., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., et al. (2015). Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, E3609-3618.
- Bonham, L.W., Desikan, R.S., and Yokoyama, J.S. (2016). The relationship between complement factor C3, APOE ε4, amyloid and tau in Alzheimer's disease.
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J.M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., et al. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* *8*, 343–357.
- Borea, P.A., Gessi, S., Merighi, S., and Varani, K. (2016). Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 419–434.

- Borea, P.A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., and Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews* 98, 1591–1625.
- Borota, D., Murray, E., Keceli, G., Chang, A., Watabe, J.M., Ly, M., Toscano, J.P., and Yassa, M.A. (2014). Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat. Neurosci.* 17, 201–203.
- Bou Samra, E., Buhagiar-Labarchède, G., Machon, C., Guitton, J., Onclercq-Delic, R., Green, M.R., Alibert, O., Gazin, C., Veaute, X., and Amor-Guélet, M. (2017). A role for Tau protein in maintaining ribosomal DNA stability and cytidine deaminase-deficient cell survival. *Nature Communications* 8.
- Boxer, A.L., Yu, J.-T., Golbe, L.I., Litvan, I., Lang, A.E., and Höglinger, G.U. (2017). Advances in progressive supranuclear palsy: new diagnostic criteria, biomarkers, and therapeutic approaches. *The Lancet. Neurology* 16, 552–563.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259.
- Bradford, K.L., Moretti, F.A., Carbonaro-Sarracino, D.A., Gaspar, H.B., and Kohn, D.B. (2017). Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID): Molecular Pathogenesis and Clinical Manifestations. *J. Clin. Immunol.* 37, 626–637.
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J., and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519–523.
- Brambilla, D., Chapman, D., and Greene, R. (2005). Adenosine mediation of presynaptic feedback inhibition of glutamate release. *Neuron* 46, 275–283.
- Brambilla, R., Cottini, L., Fumagalli, M., Ceruti, S., and Abbracchio, M.P. (2003). Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia* 43, 190–194.
- Brendel, M., Kleinberger, G., Probst, F., Jaworska, A., Overhoff, F., Blume, T., Albert, N.L., Carlsen, J., Lindner, S., Gildehaus, F.J., et al. (2017). Increase of TREM2 during Aging of an Alzheimer’s Disease Mouse Model Is Paralleled by Microglial Activation and Amyloidosis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9.
- Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci.* 14, 1030–1037.
- Brier, M.R., Gordon, B., Friedrichsen, K., McCarthy, J., Stern, A., Christensen, J., Owen, C., Aldea, P., Su, Y., Hassenstab, J., et al. (2016). Tau and A β imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer’s disease. *Science Translational Medicine* 8, 338ra66-338ra66.
- Brion, J.-P., Passareido, H., Nunez, J., and Flament-Durand, J. (1985a). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d’Alzheimer. *Arch. Biol.*
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985b). Neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease: an immunohistochemical study. *Journal of Submicroscopic Cytology* 17, 89–96.

- Brodie, C., Blumberg, P.M., and Jacobson, K.A. (1998). Activation of the A_{2A} adenosine receptor inhibits nitric oxide production in glial cells. *FEBS Letters* 429, 139–142.
- Bruns, R.F., Lu, G.H., and Pugsley, T.A. (1986). Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* 29, 331–346.
- Buchthal, F., and Folkow, B. (1944). Close Arterial Injection of Adenosine Triphosphate and Inorganic Triphosphate into Frog Muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 8, 312–316.
- Buchthal, F., and Folkow, B. (1948). Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol. Scand.* 15, 150–160.
- Buchthal, F., and Kahlson, G. (1944). The Motor Effect of Adenosine Triphosphate and Allied Phosphorus Compounds on Smooth Mammalian Muscle¹. *Acta Physiologica Scandinavica* 8, 325–334.
- Buchthal, F., Engbaek, L., Sten-Knudsen, O., and Thomasen, E. (1947). Application of adenosinetriphosphate and related compounds to the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 106, 3.
- Buée Scherrer, V., Hof, P.R., Buée, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D.P., Olanow, C.W., and Delacourte, A. (1996). Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathologica* 91, 351–359.
- Buée-Scherrer, V., Buée, L., Leveugle, B., Perl, D.P., Vermersch, P., Hof, P.R., and Delacourte, A. (1997). Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of Neurology* 42, 356–359.
- Burgin, K.E., Waxham, M.N., Rickling, S., Westgate, S.A., Mobley, W.C., and Kelly, P.T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* 10, 1788–1798.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci.* 33, 153–161.
- Burlot, M.-A., Braudeau, J., Michaelsen-Preusse, K., Potier, B., Ayciriex, S., Varin, J., Gautier, B., Djelti, F., Audrain, M., Dauphinot, L., et al. (2015). Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Human Molecular Genetics* 24, 5965–5976.
- Burnouf, S., Martire, A., Derisbourg, M., Laurent, C., Belarbi, K., Leboucher, A., Fernandez-Gomez, F.J., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Grosjean, M.-E., et al. (2013). NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell* 12, 11–23.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509–581.
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* 62, 491–503.

Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormone: A Multidisciplinary Approach* 107–118.

Burnstock, G. (1996). P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found. Symp.* 198, 1–28; discussion 29–34.

Burnstock, G. (2007). Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiological Reviews* 87, 659–797.

Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16, 433–440.

Burnstock, G., and Verkhratsky, A. (2012). Evolution of Purinergic Signalling. In *Purinergic Signalling and the Nervous System*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 245–305.

Butovsky, O., and Weiner, H.L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 622–635.

C

Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., and Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience* 17, 1022–1030.

Calafate, S., Buist, A., Miskiewicz, K., Vijayan, V., Daneels, G., de Strooper, B., de Wit, J., Verstreken, P., and Moechars, D. (2015). Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Reports* 11, 1176–1183.

Calegari, F., Coco, S., Taverna, E., Bassetti, M., Verderio, C., Corradi, N., Matteoli, M., and Rosa, P. (1999). A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 22539–22547.

van Calker, D., Müller, M., and Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 33, 999–1005.

Campos-Romo, A., Ojeda-Flores, R., Moreno-Briseño, P., and Fernandez-Ruiz, J. (2009). Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the HALLWAY task. *J. Neurosci. Methods* 177, 361–368.

Canas, P.M., Porciuncula, L.O., Cunha, G.M. a., Silva, C.G., Machado, N.J., Oliveira, J.M. a., Oliveira, C.R., and Cunha, R. a. (2009a). Adenosine A2A Receptor Blockade Prevents Synaptotoxicity and Memory Dysfunction Caused by β -Amyloid Peptides via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Neuroscience* 29, 14741–14751.

Canas, P.M., Duarte, J.M.N., Rodrigues, R.J., Köfalvi, A., and Cunha, R.A. (2009b). Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiology of Aging* 30, 1877–1884.

Canas, P.M., Porciúncula, L.O., Simões, A.P., Augusto, E., Silva, H.B., Machado, N.J., Gonçalves, N., Alfaro, T.M., Gonçalves, F.Q., Araújo, I.M., et al. (2018). Neuronal Adenosine A2A Receptors Are Critical Mediators of Neurodegeneration Triggered by Convulsions. *Eneuro* 5, ENEURO.0385-18.2018.

Cantoni, G.L. (1952). THE NATURE OF THE ACTIVE METHYL DONOR FORMED ENZYMATIALLY FROM L-METHIONINE AND ADENOSINETRIPHOSPHATE_{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2942–2943.

Canup, R.M., and Asphaug, E. (2001). Origin of the Moon in a giant impact near the end of the Earth's formation. *Nature* 412, 708–712.

Cao, C., Wang, L., Lin, X., Mamcarz, M., Zhang, C., Bai, G., Nong, J., Sussman, S., and Arendash, G. (2011). Caffeine synergizes with another coffee component to increase plasma GCSF: linkage to cognitive benefits in Alzheimer's mice. *J. Alzheimers Dis.* 25, 323–335.

Cappelletti, S., Piacentino, D., Daria, P., Sani, G., and Aromatario, M. (2015). Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr Neuropharmacol* 13, 71–88.

Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–924.

Carpenter, B., and Lebon, G. (2017). Human Adenosine A2A Receptor: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. *Front. Pharmacol.* 8, 898.

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 32, 2249–2259.

Carter, S.F., Schöll, M., Almkvist, O., Wall, A., Engler, H., Långström, B., and Nordberg, A. (2012). Evidence for astrogliosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J. Nucl. Med.* 53, 37–46.

Casadó-Anguera, V., Bonaventura, J., Moreno, E., Navarro, G., Cortés, A., Ferré, S., and Casadó, V. (2016). Evidence for the heterotetrameric structure of the adenosine A_{2A} – dopamine D₂ receptor complex. *Biochemical Society Transactions* 44, 595–600.

Castillo-Carranza, D.L., Guerrero-Muñoz, M.J., Sengupta, U., Hernandez, C., Barrett, A.D.T., Dineley, K., and Kaye, R. (2015). Tau immunotherapy modulates both pathological tau and upstream amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Neurosci.* 35, 4857–4868.

Cellai, L., Carvalho, K., Faivre, E., Deleau, A., Vieau, D., Buée, L., Blum, D., Mériaux, C., and Gomez-Murcia, V. (2018). The Adenosinergic Signaling: A Complex but Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* 12.

Cervetto, C., Venturini, A., Passalacqua, M., Guidolin, D., Genedani, S., Fuxe, K., Borroto-Esqueda, D.O., Cortelli, P., Woods, A., Maura, G., et al. (2017). A2A-D2 receptor-receptor

interaction modulates gliotransmitter release from striatal astrocyte processes. *Journal of Neurochemistry* *140*, 268–279.

Cha, J.H., Frey, A.S., Alsdorf, S.A., Kerner, J.A., Kosinski, C.M., Mangiarini, L., Penney, J.B., Davies, S.W., Bates, G.P., and Young, A.B. (1999). Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *354*, 981–989.

Chang, K.-J., Redmond, S.A., and Chan, J.R. (2016). Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nat Neurosci* *19*, 190–197.

Chatterjee, S., Cassel, R., Schneider-Anthony, A., Merienne, K., Cosquer, B., Tzeplaeff, L., Halder Sinha, S., Kumar, M., Chaturbedy, P., Eswaramoorthy, M., et al. (2018). Reinstating plasticity and memory in a tauopathy mouse model with an acetyltransferase activator. *EMBO Molecular Medicine* e8587.

Chen, G.-F., Xu, T.-H., Yan, Y., Zhou, Y.-R., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, H.E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* *38*, 1205–1235.

Chen, J., Tan, Z., Zeng, L., Zhang, X., He, Y., Gao, W., Wu, X., Li, Y., Bu, B., Wang, W., et al. (2013). Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *Glia* *61*, 178–191.

Chen, J.-F., Lee, C., and Chern, Y. (2014a). *Adenosine Receptor Neurobiology: Overview* (Elsevier Inc.).

Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Zhong, M., Xu, S., Chen, C., Li, L., and Yu, Z. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International* *60*, 233–242.

Chen, Z., Xiong, C., Pancyr, C., Stockwell, J., Walz, W., and Cayabyab, F.S. (2014b). Prolonged adenosine A1 receptor activation in hypoxia and pial vessel disruption focal cortical ischemia facilitates clathrin-mediated AMPA receptor endocytosis and long-lasting synaptic inhibition in rat hippocampal CA3-CA1 synapses: differential regulation of GluA2 and GluA1 subunits by p38 MAPK and JNK. *J. Neurosci.* *34*, 9621–9643.

Chevalier-Larsen, E., and Holzbaur, E.L.F. (2006). Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1762*, 1094–1108.

Chever, O., Lee, C.-Y., and Rouach, N. (2014). Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* *34*, 11228–11232.

Chiu, J., DeSalle, R., Lam, H.M., Meisel, L., and Coruzzi, G. (1999). Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Mol. Biol. Evol.* *16*, 826–838.

Chou, S.-Y., Lee, Y.-C., Chen, H.-M., Chiang, M.-C., Lai, H.-L., Chang, H.-H., Wu, Y.-C., Sun, C.-N., Chien, C.-L., Lin, Y.-S., et al. (2005). CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. *Journal of Neurochemistry* *93*, 310–320.

- Choy, R.W.-Y., Cheng, Z., and Schekman, R. (2012). Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β ($A\beta$) production in the trans-Golgi network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, E2077-2082.
- Chung, H.J., Ge, W.-P., Qian, X., Wiser, O., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2009). G protein-activated inwardly rectifying potassium channels mediate depotentiation of long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 635–640.
- Ciruela, F., Casadó, V., Rodrigues, R.J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S.R., Mallol, J., et al. (2006). Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci.* *26*, 2080–2087.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* *33*, 18–41.
- Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Münch, A.E., Heiman, M., and Barres, B.A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* *115*, E1896–E1905.
- Clasadonte, J., McIver, S.R., Schmitt, L.I., Halassa, M.M., and Haydon, P.G. (2014). Chronic sleep restriction disrupts sleep homeostasis and behavioral sensitivity to alcohol by reducing the extracellular accumulation of adenosine. *J. Neurosci.* *34*, 1879–1891.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology* *11*, 909–913.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *Journal of Molecular Biology* *116*, 227–247.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* *63*, 641–683.
- Cohen, S., and Fishman, P. (2019). Targeting the A3 adenosine receptor to treat cytokine release syndrome in cancer immunotherapy. *Drug Des Devel Ther* *13*, 491–497.
- Cohen, T.J., Guo, J.L., Hurtado, D.E., Kwong, L.K., Mills, I.P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun* *2*, 252.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Pugliese, A.M., and Pedata, F. (2013). Adenosine A_{2A} receptors inhibit delayed rectifier potassium currents and cell differentiation in primary purified oligodendrocyte cultures. *Neuropharmacology* *73*, 301–310.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Dettori, I., Melani, A., Pugliese, A.M., and Pedata, F. (2015). Role of adenosine in oligodendrocyte precursor maturation. *Front Cell Neurosci* *9*, 155.
- Corti, F., Cellai, L., Melani, A., Donati, C., Bruni, P., and Pedata, F. (2013). Adenosine is present in rat brain synaptic vesicles. *Neuroreport* *24*, 982–987.

- Costenla, A.R., Diógenes, M.J., Canas, P.M., Rodrigues, R.J., Nogueira, C., Maroco, J., Agostinho, P.M., Ribeiro, J.A., Cunha, R.A., and de Mendonça, A. (2011). Enhanced role of adenosine A2A receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing: Ageing, adenosine and LTP. *European Journal of Neuroscience* *34*, 12–21.
- Coulthard, L.G., Hawksworth, O.A., and Woodruff, T.M. (2018). Complement: The Emerging Architect of the Developing Brain. *Trends Neurosci.* *41*, 373–384.
- Cousins, S.L., Hoey, S.E.A., Anne Stephenson, F., and Perkinson, M.S. (2009). Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery. *J. Neurochem.* *111*, 1501–1513.
- Crary, J.F., Trojanowski, J.Q., Schneider, J.A., Abisambra, J.F., Abner, E.L., Alafuzoff, I., Arnold, S.E., Attems, J., Beach, T.G., Bigio, E.H., et al. (2014). Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathologica* *128*, 755–766.
- Cripps, D., Thomas, S.N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P., and Yang, A.J. (2006). Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* *281*, 10825–10838.
- Cristóvão-Ferreira, S., Navarro, G., Brugarolas, M., Pérez-Capote, K., Vaz, S.H., Fattorini, G., Conti, F., Lluís, C., Ribeiro, J.A., McCormick, P.J., et al. (2013). A1R–A2AR heteromers coupled to Gs and Gi/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signalling* *9*, 433–449.
- Crooke, A., Martínez-Henández, J., Martínez-López, J., Cruz-Jentoft, A., Huete-Toral, F., and Pintor, J. (2017). Low expression of CD39 and CD73 genes in centenarians compared with octogenarians. *Immun Ageing* *14*, 11.
- Cunha, R.A. (2016). How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry* *139*, 1019–1055.
- Cunha, R.A., and Ribeiro, J.A. (2000). Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* *39*, 1156–1167.
- Cunha, G.M.A., Canas, P.M., Melo, C.S., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2008). Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp. Neurol.* *210*, 776–781.
- Cunha, R.A., Johansson, B., van der Ploeg, I., Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., and Fredholm, B.B. (1994). Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res.* *649*, 208–216.
- Cunha, R.A., Constantino, M.C., Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (1995). Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. *Neuroreport* *6*, 1583–1588.
- Cunha, R.A., Correia-de-Sá, P., Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (1996a). Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses

by adenosine formed from released adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology* 119, 253–260.

Cunha, R.A., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (1996b). Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 67, 2180–2187.

Currais, A., Kato, K., Canuet, L., Ishii, R., Tanaka, T., Takeda, M., and Soriano, S. (2011). Caffeine Modulates Tau Phosphorylation and Affects Akt Signaling in Postmitotic Neurons. *Journal of Molecular Neuroscience* 43, 326–332.

Cuyvers, E., and Sleegers, K. (2016). Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *Lancet Neurol* 15, 857–868.

D

Dai, Q.-H., and Gong, D.-K. (2019). Association of the Polymorphisms and Plasma Level of CHI3L1 with Alzheimer's Disease in the Chinese Han Population: A Case-Control Study. *Neuropsychobiology* 77, 29–37.

Dai, S.S., Zhou, Y.G., Li, W., An, J.H., Li, P., Yang, N., Chen, X.Y., Xiong, R.P., Liu, P., Zhao, Y., et al. (2010). Local Glutamate Level Dictates Adenosine A_{2A} Receptor Regulation of Neuroinflammation and Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroscience* 30, 5802–5810.

Dai, X., Chang, P., Li, X., Gao, Z., and Sun, Y. (2018). The inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) in HEK293 APP_{swe} cells. *Neurosci. Lett.* 665, 80–85.

Dall'Igna, O.P., Porciuncula, L.O., Souza, D.O., Cunha, R.A., and Lara, D.R. (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 138, 1207–1209.

Dall'Igna, O.P., Fett, P., Gomes, M.W., Souza, D.O., Cunha, R.A., and Lara, D.R. (2007). Caffeine and adenosine A_{2A} receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* 203, 241–245.

Dall'Igna, O.P., Porciuncula, L.O., Souza, D.O., Cunha, R.A., and Lara, D.R. (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity. *British Journal of Pharmacology* 138, 1207–1209.

Dalrymple, G.B. (1994). *The Age of the Earth* (Stanford University Press).

Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412.

Dansokho, C., Ait Ahmed, D., Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., Cagnard, N., Holzenberger, M., Piaggio, E., Aucouturier, P., et al. (2016). Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain* 139, 1237–1251.

- Darvish, A., Pomerantz, R.W., Zografides, P.G., and Metting, P.J. (1996). Contribution of cytosolic and membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. *Am. J. Physiol.* *271*, H2162-2167.
- Davies, D.S., Ma, J., Jegathees, T., and Goldsbury, C. (2017). Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* *27*, 795–808.
- Dawkins, E., Gasperini, R., Hu, Y., Cui, H., Vincent, A.J., Bolós, M., Young, K.M., Foa, L., and Small, D.H. (2014). The N-terminal fragment of the β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease (N-APP) binds to phosphoinositide-rich domains on the surface of hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* *92*, 1478–1489.
- De Nuccio, C., Bernardo, A., Ferrante, A., Pepponi, R., Martire, A., Falchi, M., Visentin, S., Popoli, P., and Minghetti, L. (2019). Adenosine A2A receptor stimulation restores cell functions and differentiation in Niemann-Pick type C-like oligodendrocytes. *Sci Rep* *9*, 9782.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. *Physiological Reviews* *90*, 465–494.
- Decking, U.K., Arens, S., Schlieper, G., Schulze, K., and Schrader, J. (1997). Dissociation between adenosine release, MVO₂, and energy status in working guinea pig hearts. *Am. J. Physiol.* *272*, H371-381.
- Dejanovic, B., Huntley, M.A., De Mazière, A., Meilandt, W.J., Wu, T., Srinivasan, K., Jiang, Z., Gandham, V., Friedman, B.A., Ngu, H., et al. (2018). Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. *Neuron* *100*, 1322-1336.e7.
- Delacourte, A., and Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *Journal of the Neurological Sciences* *76*, 173–186.
- Delekate, A., Füchtmeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddis, M., and Petzold, G.C. (2014). Metabotropic P2Y₁ receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications* *5*.
- Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., Chambraud, B., Baulieu, E.-E., Jacquot, Y., Landrieu, I., Lippens, G., et al. (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *114*, 201708448.
- Deussen, A., Borst, M., and Schrader, J. (1988). Formation of S-adenosylhomocysteine in the heart. I: An index of free intracellular adenosine. *Circ. Res.* *63*, 240–249.
- Deussen, A., Stappert, M., Schäfer, S., and Kelm, M. (1999). Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* *99*, 2041–2047.
- Deyts, C., Thinakaran, G., and Parent, A.T. (2016). APP Receptor? To Be or Not To Be. *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 390–411.

- Dias, R.B., Rombo, D.M., Ribeiro, J. a., Henley, J.M., and Sebastião, A.M. (2013). Adenosine: Setting the stage for plasticity. *Trends in Neurosciences* 36, 248–257.
- Diógenes, M.J., Assaife-Lopes, N., Pinto-Duarte, A., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (2007). Influence of age on BDNF modulation of hippocampal synaptic transmission: interplay with adenosine A2A receptors. *Hippocampus* 17, 577–585.
- Diogenes, M.J., Neves-Tome, R., Fucile, S., Martinello, K., Scianni, M., Theofilas, P., Lopatar, J., Ribeiro, J.A., Maggi, L., Frenguelli, B.G., et al. (2014). Homeostatic Control of Synaptic Activity by Endogenous Adenosine is Mediated by Adenosine Kinase. *Cerebral Cortex* 24, 67–80.
- Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086–1089.
- Dixon, A.K., Gubitz, A.K., Sirinathsinghji, D.J., Richardson, P.J., and Freeman, T.C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1461–1468.
- Dobin, A., and Gingeras, T.R. (2015). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr Protoc Bioinformatics* 51, 11.14.1-19.
- Doengi, M., Deitmer, J.W., and Lohr, C. (2008). New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J.* 22, 2368–2378.
- Domenici, M.R., Scattoni, M.L., Martire, A., Lastoria, G., Potenza, R.L., Borioni, A., Venerosi, A., Calamandrei, G., and Popoli, P. (2007). Behavioral and electrophysiological effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 in R6/2 Huntington’s disease mice. *Neurobiology of Disease* 28, 197–205.
- Domenici, M.R., Ferrante, A., Martire, A., Chiodi, V., Pepponi, R., Tebano, M.T., and Popoli, P. (2019). Adenosine A2A receptor as potential therapeutic target in neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Res.* 104338.
- Domise, M., Didier, S., Marinangeli, C., Zhao, H., Chandakkar, P., Buée, L., Viollet, B., Davies, P., Marambaud, P., and Vingtdeux, V. (2016). AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Scientific Reports* 6, 1–12.
- Dorval, V., and Fraser, P.E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 281, 9919–9924.
- Doty, K.R., Guillot-Sestier, M.-V., and Town, T. (2015). The role of the immune system in neurodegenerative disorders: adaptive or maladaptive? *Brain Res* 1617, 155–173.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 7679–7688.

Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297–308.

Drury, A.N., and Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (Lond.)* 68, 213–237.

Duan, R.-S., Yang, X., Chen, Z.-G., Lu, M.-O., Morris, C., Winblad, B., and Zhu, J. (2008). Decreased fractalkine and increased IP-10 expression in aged brain of APP(swe) transgenic mice. *Neurochem. Res.* 33, 1085–1089.

Dubois, B., Epelbaum, S., Nyasse, F., Bakardjian, H., Gagliardi, G., Uspenskaya, O., Houot, M., Lista, S., Cacciamani, F., Potier, M.-C., et al. (2018). Cognitive and neuroimaging features and brain β -amyloidosis in individuals at risk of Alzheimer's disease (INSIGHT-preAD): a longitudinal observational study. *Lancet Neurol* 17, 335–346.

Dubyak, G.R. (1991). Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4, 295–300.

Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., et al. (2014). Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathologica Communications* 2.

Dulla, C.G., Dobelis, P., Pearson, T., Frenguelli, B.G., Staley, K.J., and Masino, S.A. (2005). Adenosine and ATP link PCO₂ to cortical excitability via pH. *Neuron* 48, 1011–1023.

Dunwiddie, T.V., and Masino, S.A. (2001). The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience* 24, 31–55.

Dunwiddie, T.V., Diao, L., and Proctor, W.R. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 7673–7682.

Duyckaerts, C., Bennefib, M., Grignon, Y., Uchihara, T., He, Y., Piette, F., and Hauw, J.J. (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol Aging* 18, 267–273.

Duyckaerts, C., Braak, H., Brion, J.-P., Buée, L., Del Tredici, K., Goedert, M., Halliday, G., Neumann, M., Spillantini, M.G., Tolnay, M., et al. (2015). PART is part of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 129, 749–756.

E

Eckle, T., Kewley, E.M., Brodsky, K.S., Tak, E., Bonney, S., Gobel, M., Anderson, D., Glover, L.E., Riegel, A.K., Colgan, S.P., et al. (2014). Identification of Hypoxia-Inducible Factor HIF-1A as Transcriptional Regulator of the A2B Adenosine Receptor during Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology* 192, 1249–1256.

- Egan, T.M., and Khakh, B.S. (2004). Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci.* *24*, 3413–3420.
- El-Agnaf, O.M., Mahil, D.S., Patel, B.P., and Austen, B.M. (2000). Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *273*, 1003–1007.
- Erb, L., and Weisman, G.A. (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* *1*, 789–803.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* *248*, 1122–1124.
- Eskelinen, M.H., and Kivipelto, M. (2010). Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* *20 Suppl 1*, S167-74.
- Eskelinen, M.H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Kivipelto, M. (2009). Midlife Coffee and Tea Drinking and the Risk of Late-Life Dementia: A Population-Based CAIDE Study. *Journal of Alzheimer's Disease* *16*, 85–91.
- Evans, J.C. (1992). *Tea in China: The History of China's National Drink* (New York: Praeger).

F

- Faivre, E., Coelho, J., Zornbach, K., Malik, E., Marciniak, E., Cellai, L., Carvalho, K., Flaten, V., Demeyer, D., Eddarkaoui, S., et al. (2016). Oral administration of MSX-3, an adenosine A2A antagonist, reduces amyloid load and memory deficits of APP/PS1dE9 mice. p.
- Faivre, E., Coelho, J.E., Zornbach, K., Malik, E., Baqi, Y., Schneider, M., Cellai, L., Carvalho, K., Sebda, S., Figeac, M., et al. (2018). Beneficial Effect of a Selective Adenosine A2A Receptor Antagonist in the APP^{swE}/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* *11*, 235.
- Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Vidal, R., Crowther, R.A., Ghetti, B., Scheres, S.H.W., and Goedert, M. (2018). Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature* *1*.
- Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A.G., Garringer, H.J., Vidal, R., Crowther, R.A., Newell, K.L., Ghetti, B., Goedert, M., et al. (2019). Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature* *568*, 420–423.
- Fan, Z., Okello, A.A., Brooks, D.J., and Edison, P. (2015). Longitudinal influence of microglial activation and amyloid on neuronal function in Alzheimer's disease. *Brain* *138*, 3685–3698.
- Feldberg, W., and Sherwood, S.L. (1954). Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* *123*, 148–167.

- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Ferré, S., Popoli, P., Giménez-Llort, L., Finnman, U.B., Martínez, E., Scotti de Carolis, A., and Fuxe, K. (1994a). Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. *Neuroreport* 6, 73–76.
- Ferré, S., O'Connor, W.T., Snaprud, P., Ungerstedt, U., and Fuxe, K. (1994b). Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 63, 765–773.
- Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B.T., Popoli, P., Burgueño, J., Gutiérrez, M.A., Casadó, V., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Lluís, C., et al. (2002). Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11940–11945.
- Ferre, S., Ciruela, F., Borycz, J., Solinas, M., Quarta, D., Antoniou, K., Quiroz, C., Justinova, Z., Lluís, C., Franco, R., et al. (2008). Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front. Biosci.* 13, 2391–2399.
- Ferré, S., Bonaventura, J., Tomasi, D., Navarro, G., Moreno, E., Cortés, A., Lluís, C., Casadó, V., and Volkow, N.D. (2016). Allosteric mechanisms within the adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology* 104, 154–160.
- Ferré, S., Bonaventura, J., Zhu, W., Hatcher-Solis, C., Taura, J., Quiroz, C., Cai, N.-S., Moreno, E., Casadó-Anguera, V., Kravitz, A.V., et al. (2018). Essential Control of the Function of the Striatopallidal Neuron by Pre-coupled Complexes of Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor Heterotetramers and Adenylyl Cyclase. *Front Pharmacol* 9, 243.
- Ferreira, J.J., Lees, A., Rocha, J.-F., Poewe, W., Rascol, O., Soares-da-Silva, P., and Bi-Park 1 investigators (2016). Opicapone as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and end-of-dose motor fluctuations: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet Neurol* 15, 154–165.
- Ferreira, R.N., de Miranda, A.S., Rocha, N.P., Simoes E Silva, A.C., Teixeira, A.L., and da Silva Camargos, E.R. (2018). Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: What Have we Learned from Pre-Clinical and Clinical Studies? *Curr. Med. Chem.* 25, 3682–3702.
- Fiala, M., Liu, Q.N., Sayre, J., Pop, V., Brahmandam, V., Graves, M.C., and Vinters, H.V. (2002). Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 360–371.
- Filipello, F., Morini, R., Corradini, I., Zerbi, V., Canzi, A., Michalski, B., Erreni, M., Markicevic, M., Starvaggi-Cucuzza, C., Otero, K., et al. (2018). The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity* 48, 979-991.e8.
- Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., and Kinnamon, S.C. (2005). ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495–1499.

- Fischer, E. (1884). Ueber die Harnsäure. I [On uric acid. I.]. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* *17*, 328–338.
- Fischer, E. (1898). Ueber das Purin und seine Methylderivate [On purine and its methyl derivatives]. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* *31*, 2550–2574.
- Fischer-Colbrie, R., Kirchmair, R., Schobert, A., Olenik, C., Meyer, D.K., and Winkler, H. (1993). Secretogranin II is synthesized and secreted in astrocyte cultures. *J. Neurochem.* *60*, 2312–2314.
- Fisone, G., Borgkvist, A., and Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 857–872.
- Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., and Scheres, S.H.W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*.
- Flajolet, M., Wang, Z., Futter, M., Shen, W., Nuangchamng, N., Bendor, J., Palaszewski, I., Nairn, A.C., Surmeier, D.J., and Greengard, P. (2008). FGF acts as a co-transmitter through Adenosine A2A receptor to regulate morphological and physiological synaptic plasticity. *Nat Neurosci* *11*, 1402–1409.
- Flaten, V., Laurent, C., Coelho, J.E., Sandau, U., Batalha, V.L., Burnouf, S., Hamdane, M., Humez, S., Boison, D., Lopes, L.V., et al. (2014). From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer's disease? *Biochem Soc Trans* *42*, 587–592.
- Fonseca, M.I. (2004). Absence of C1q Leads to Less Neuropathology in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* *24*, 6457–6465.
- Fonseca, M.I., Chu, S., Pierce, A.L., Brubaker, W.D., Hauhart, R.E., Mastroeni, D., Clarke, E.V., Rogers, J., Atkinson, J.P., and Tenner, A.J. (2016). Analysis of the Putative Role of CR1 in Alzheimer's Disease: Genetic Association, Expression and Function. *PLOS ONE* *11*, e0149792.
- Fonseca, M.I., Chu, S.-H., Hernandez, M.X., Fang, M.J., Modarresi, L., Selvan, P., MacGregor, G.R., and Tenner, A.J. (2017). Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *Journal of Neuroinflammation* *14*.
- Forrest, S.L., Kril, J.J., Stevens, C.H., Kwok, J.B., Hallupp, M., Kim, W.S., Huang, Y., McGinley, C.V., Werka, H., Kiernan, M.C., et al. (2018). Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies. *Brain* *141*, 521–534.
- Fountain, S.J., and Burnstock, G. (2009). An evolutionary history of P2X receptors. *Purinergic Signal.* *5*, 269–272.
- Frappier, T.F., Georgieff, I.S., Brown, K., and Shelanski, M.L. (1994). tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *Journal of Neurochemistry* *63*, 2288–2294.
- Fraser, P.E. (2014). Prions and prion-like proteins. *The Journal of Biological Chemistry* *289*, 19839–19840.

Fredholm, B.B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., and Zvartau, E.E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* *51*, 83–133.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., and Linden, J. (2001a). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* *53*, 527–552.

Fredholm, B.B., Irenius, E., Kull, B., and Schulte, G. (2001b). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* *61*, 443–448.

Fredholm, B.B., Chen, J.-F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.-M. (2005a). Adenosine and Brain Function. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 191–270.

Fredholm, B.B., Chen, J.-F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.-M. (2005b). Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* *63*, 191–270.

Fredholm, B.B., Chern, Y., Franco, R., and Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Progress in Neurobiology* *83*, 263–276.

Freguelli, B.G., Wigmore, G., Llaudet, E., and Dale, N. (2007). Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus. *J. Neurochem.* *101*, 1400–1413.

Friedrich, R.P., Tepper, K., Rönicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C., and Fändrich, M. (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 1942–1947.

Furlong, T.J., Pierce, K.D., Selbie, L.A., and Shine, J. (1992). Molecular characterization of a human brain adenosine A2 receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *15*, 62–66.

G

Galindo, A., Krnjević, K., and Schwartz, S. (1967). Micro-iontophoretic studies on neurones in the cuneate nucleus. *J. Physiol. (Lond.)* *192*, 359–377.

Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., et al. (2003). Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10032–10037.

Gandhi, N.S., Landrieu, I., Byrne, C., Kukic, P., Amniai, L., Cantrelle, F.X., Wieruszeski, J.M., Mancera, R.L., Jacquot, Y., and Lippens, G. (2015). A phosphorylation-induced turn defines the Alzheimer's disease AT8 antibody epitope on the tau protein. *Angewandte Chemie - International Edition* *54*, 6819–6823.

Ganesana, M., and Venton, B.J. (2018). Early changes in transient adenosine during cerebral ischemia and reperfusion injury. *PLoS ONE* *13*, e0196932.

- Garcia, A.D.R., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., and Sofroniew, M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7, 1233–1241.
- Garvey, E.P., and Prus, K.L. (1999). A specific inhibitor of heart cytosolic 5'-nucleotidase I attenuates hydrolysis of adenosine 5'-monophosphate in primary rat myocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 364, 235–240.
- Gass, N., Porkka-Heiskanen, T., and Kalinchuk, A.V. (2009). The role of the basal forebrain adenosine receptors in sleep homeostasis. *Neuroreport* 20, 1013–1018.
- Gebicke-Harterter, P.J., Christoffel, F., Timmer, J., Northoff, H., Berger, M., and Van Calker, D. (1996). Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* 29, 37–42.
- Gelber, R.P., Petrovitch, H., Masaki, K.H., Ross, G.W., and White, L.R. (2011). Coffee Intake in Midlife and Risk of Dementia and its Neuropathologic Correlates. *Journal of Alzheimer's Disease* 23, 607–615.
- George, J., Gonçalves, F.Q., Cristóvão, G., Rodrigues, L., Meyer Fernandes, J.R., Gonçalves, T., Cunha, R.A., and Gomes, C.A. (2015). Different danger signals differently impact on microglial proliferation through alterations of ATP release and extracellular metabolism. *Glia* 63, 1636–1645.
- Gessi, S., Merighi, S., Stefanelli, A., Fazzi, D., Varani, K., and Borea, P.A. (2013). A1 and A3 adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. *Pharmacological Research* 76, 157–170.
- Ghosh, S., Wu, M.D., Shaftel, S.S., Kyrkanides, S., LaFerla, F.M., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. (2013). Sustained Interleukin-1 β Overexpression Exacerbates Tau Pathology Despite Reduced Amyloid Burden in an Alzheimer's Mouse Model. *J Neurosci* 33, 5053–5064.
- Gillespie, J.H. (1934). The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J. Physiol. (Lond.)* 80, 345–359.
- Giménez-Llort, L., Schiffmann, S.N., Shmidt, T., Canela, L., Camón, L., Wassholm, M., Canals, M., Terasmaa, A., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., et al. (2007). Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem* 87, 42–56.
- Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L.M. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABAA receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505–519.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.

- Golde, T.E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L.H., and Younkin, S.G. (1990). Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4, 253–267.
- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D.I., Gonçalves, N., and Cunha, R.A. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *Journal of Neuroinflammation* 10.
- Gonçalves, F.Q., Lopes, J.P., Silva, H.B., Lemos, C., Silva, A.C., Gonçalves, N., Tomé, Â.R., Ferreira, S.G., Canas, P.M., Rial, D., et al. (2019a). Synaptic and memory dysfunction in a β -amyloid model of early Alzheimer's disease depends on increased formation of ATP-derived extracellular adenosine. *Neurobiol. Dis.* 104570.
- Gonçalves, F.Q., Lopes, J.P., Silva, H.B., Lemos, C., Silva, A.C., Gonçalves, N., Tomé, Â.R., Ferreira, S.G., Canas, P.M., Rial, D., et al. (2019b). Synaptic and memory dysfunction in a β -amyloid model of early Alzheimer's disease depends on increased formation of ATP-derived extracellular adenosine. *Neurobiology of Disease* 132, 104570.
- Gong, C.X., Lidsky, T., Wegiel, J., Zuck, L., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 275, 5535–5544.
- Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Molecular Biology of the Cell* 8, 353–365.
- Goodman, R.R., and Synder, S.H. (1982). Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. *J. Neurosci.* 2, 1230–1241.
- Goodman, J., Sherratt, A., and Lovejoy, P.E. (2007). *Consuming Habits: Drugs in History and Anthropology* (Milton Park, Abingdon, Oxon ; New York: Routledge).
- Gordon, J.L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233, 309–319.
- Gordon, G.R.J., Howarth, C., and MacVicar, B.A. (2011). Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp. Physiol.* 96, 393–399.
- Gorlovoy, P., Larionov, S., Pham, T.T.H., and Neumann, H. (2009). Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. *The FASEB Journal* 23, 2502–2513.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293, 1491–1495.
- Götz, J., Halliday, G., and Nisbet, R.M. (2019). Molecular Pathogenesis of the Tauopathies. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 14, 239–261.

Gracia, E., Pérez-Capote, K., Moreno, E., Barkešová, J., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., Cortés, A., Casadó, V., and Canela, E.I. (2011). A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem. J.* *435*, 701–709.

Graham, W.V., Bonito-Oliva, A., and Sakmar, T.P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med.* *68*, 413–430.

Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* *447*, 728–734.

Grober, E., Dickson, D., Sliwinski, M.J., Buschke, H., Katz, M., Crystal, H., and Lipton, R.B. (1999). Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging* *20*, 573–579.

Groot, C., van Loenhoud, A.C., Barkhof, F., van Berckel, B.N.M., Koene, T., Teunissen, C.C., Scheltens, P., van der Flier, W.M., and Ossenkuppele, R. (2018). Differential effects of cognitive reserve and brain reserve on cognition in Alzheimer disease. *Neurology* *90*, e149–e156.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *83*, 4913–4917.

Guan, Z., Kuhn, J.A., Wang, X., Colquitt, B., Solorzano, C., Vaman, S., Guan, A.K., Evans-Reinsch, Z., Braz, J., Devor, M., et al. (2016). Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nature Neuroscience* *19*, 94–101.

Gubitz, A.K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K.A., and Richardson, P.J. (1996). Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J. Neurochem.* *67*, 374–381.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., et al. (2013). *TREM2* Variants in Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* *368*, 117–127.

Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* *33*, 9511–9522.

Gyoneva, S., Shapiro, L., Lazo, C., Garnier-Amblard, E., Smith, Y., Miller, G.W., and Traynelis, S.F. (2014). Adenosine A2A receptor antagonism reverses inflammation-induced impairment of microglial process extension in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* *67*, 191–202.

H

Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* *268*, 3021–3024.

- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270.
- Habermacher, C., Dunning, K., Chataigneau, T., and Grutter, T. (2016). Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* 104, 18–30.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* 27, 6473–6477.
- Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.-Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213–219.
- Halder, R., Hennion, M., Vidal, R.O., Shomroni, O., Rahman, R.-U., Rajput, A., Centeno, T.P., van Bebber, F., Capece, V., Garcia Vizcaino, J.C., et al. (2016). DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat. Neurosci.* 19, 102–110.
- Hamdane, M., Sambo, A.-V., Delobel, P., Bégard, S., Violleau, A., Delacourte, A., Bertrand, P., Benavides, J., and Buée, L. (2003). Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 34026–34034.
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R.A., de Souza, L.C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., et al. (2016). Early and protective microglial activation in Alzheimer’s disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain* 139, 1252–1264.
- Han, H.J., Allen, C.C., Buchovecky, C.M., Yetman, M.J., Born, H.A., Marin, M.A., Rodgers, S.P., Song, B.J., Lu, H.-C., Justice, M.J., et al. (2012). Strain Background Influences Neurotoxicity and Behavioral Abnormalities in Mice Expressing the Tetracycline Transactivator. *Journal of Neuroscience* 32, 10574–10586.
- Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P., and Anderton, B.H. (1998). New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer’s disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Neurochem.* 71, 2465–2476.
- Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15, 112–119.
- Harada, K., Kamiya, T., and Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., and Ihara, Y. (1992). Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer’s disease brain. *J. Biol. Chem.* 267, 17047–17054.
- Haselkorn, M.L., Shellington, D.K., Jackson, E.K., Vagni, V.A., Janesko-Feldman, K., Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Cheng, D., Bell, M.J., Jenkins, L.W., et al. (2010). Adenosine A1 receptor activation as a brake on the microglial response after experimental traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 27, 901–910.

- Haskell, C.F., Kennedy, D.O., Wesnes, K.A., and Scholey, A.B. (2005). Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology (Berl.)* 179, 813–825.
- Haskó, G., Pacher, P., Vizi, E.S., and Illes, P. (2005). Adenosine receptor signaling in the brain immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 511–516.
- Hauber, W., and Mönkle, M. (1997). Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. *Eur. J. Pharmacol.* 323, 127–131.
- Hauber, W., Nagel, J., Sauer, R., and Müller, C.E. (1998). Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport* 9, 1803–1806.
- Haure-Mirande, J.-V., Audrain, M., Fanutza, T., Kim, S.H., Klein, W.L., Glabe, C., Readhead, B., Dudley, J.T., Blitzer, R.D., Wang, M., et al. (2017). Deficiency of TYROBP, an adapter protein for TREM2 and CR3 receptors, is neuroprotective in a mouse model of early Alzheimer's pathology. *Acta Neuropathologica* 134, 769–788.
- Hauser, R.A., Olanow, C.W., Kieburtz, K.D., Pourcher, E., Docu-Axelerad, A., Lew, M., Kozyolkin, O., Neale, A., Resburg, C., Meya, U., et al. (2014). Tozadenant (SYN115) in patients with Parkinson's disease who have motor fluctuations on levodopa: a phase 2b, double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol* 13, 767–776.
- Hawkins, A., and Olszewski, J. (1957). Glia/nerve cell index for cortex of the whale. *Science* 126, 76–77.
- Hawkins, R.A., Miller, A.L., Nielsen, R.C., and Veech, R.L. (1973). The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochem. J.* 134, 1001–1008.
- Headrick, J.P., and Willis, R.J. (1990). Relation between the O₂ supply:demand ratio, MVO₂, and adenosine formation in hearts stimulated with inotropic agents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68, 110–118.
- Henderson, J.S., Joyce, R.A., Hall, G.R., Hurst, W.J., and McGovern, P.E. (2007). Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18937–18940.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 14, 388–405.
- Heneka, M.T., McManus, R.M., and Latz, E. (2018). Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 610–621.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.

- Heo, J.S., and Han, H.J. (2006). ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Stem Cells* 24, 2637–2648.
- Hérard, A.S., Besret, L., Dubois, A., Dauguet, J., Delzescaux, T., Hantraye, P., Bonvento, G., and Moya, K.L. (2006). siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo. *Neurobiol. Aging* 27, 1740–1750.
- Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J. Cell. Sci.* 116, 1127–1136.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., et al. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 18091–18097.
- Hobbiss, A.F., Ramiro-Cortés, Y., and Israely, I. (2018). Homeostatic Plasticity Scales Dendritic Spine Volumes and Changes the Threshold and Specificity of Hebbian Plasticity. *IScience* 8, 161–174.
- Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., et al. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290, 1768–1771.
- Hof, P.R., Charpiot, A., Delacourte, A., Buée, L., Purohit, D., Perl, D.P., and Bouras, C. (1992). Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neuroscience Letters* 139, 10–14.
- Hohsfield, L.A., and Humpel, C. (2015). Migration of blood cells to β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 65, 8–15.
- Holmes, B.B., and Diamond, M.I. (2014). Prion-like Properties of Tau Protein: The Importance of Extracellular Tau as a Therapeutic Target. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 19855–19861.
- Holtman, I.R., Raj, D.D., Miller, J.A., Schaafsma, W., Yin, Z., Brouwer, N., Wes, P.D., Möller, T., Orre, M., Kamphuis, W., et al. (2015). Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathologica Communications* 3.
- Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol. (Lond.)* 145, 494–504.
- Holton, F.A., and Holton, P. (1954). The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* 126, 124–140.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716.

- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.-L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081.
- Horgusluoglu-Moloch, E., Nho, K., Risacher, S.L., Kim, S., Foroud, T., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Aisen, P.S., Petersen, R.C., Jack, C.R., et al. (2017). Targeted neurogenesis pathway-based gene analysis identifies ADORA2A associated with hippocampal volume in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 60, 92–103.
- Horiguchi, T., Uryu, K., Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., LightFoot, R., Bellmann, C., Richter-Landsberg, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2003). Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am. J. Pathol.* 163, 1021–1031.
- Hoyle, C.H.V. (2011). Evolution of neuronal signalling: transmitters and receptors. *Auton Neurosci* 165, 28–53.
- Hu, W., Zhang, X., Tung, Y.C., Xie, S., Liu, F., and Iqbal, K. (2016). Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12, 1066–1077.
- Hua, Q., and He, R.Q. (2003). Tau could protect DNA double helix structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1645, 205–211.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57.
- Huang, N.-K., Lin, J.-H., Lin, J.-T., Lin, C.-I., Liu, E.M., Lin, C.-J., Chen, W.-P., Shen, Y.-C., Chen, H.-M., Chen, J.-B., et al. (2011). A New Drug Design Targeting the Adenosinergic System for Huntington's Disease. *PLOS ONE* 6, e20934.
- Huang, W., Bai, S., Zuo, X., Tang, W., Chen, P., Chen, X., Wang, G., Wang, H., and Xie, P. (2018). An adenosine A1R-A2aR imbalance regulates low glucose/hypoxia-induced microglial activation, thereby contributing to oligodendrocyte damage through NF- κ B and CREB phosphorylation. *Int. J. Mol. Med.* 41, 3559–3569.
- Huganir, R.L., and Nicoll, R.A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80, 704–717.
- Huin, V., Deramecourt, V., Caparros-Lefebvre, D., Maurage, C.-A., Duyckaerts, C., Kovari, E., Pasquier, F., Buée-Scherrer, V., Labreuche, J., Behal, H., et al. (2016). The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain. *Mov. Disord.* 31, 1883–1890.
- Hurtado-Alvarado, G., Domínguez-Salazar, E., Velázquez-Moctezuma, J., and Gómez-González, B. (2016). A2A Adenosine Receptor Antagonism Reverts the Blood-Brain Barrier Dysfunction Induced by Sleep Restriction. *PLOS ONE* 11, e0167236.
- Hussain, A., Tabrez, E.S., Mavrych, V., Bolgova, O., and Peela, J.R. (2018). Caffeine: A Potential Protective Agent Against Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 28, 67–72.

I

Ilie, A., Raimondo, J.V., and Akerman, C.J. (2012). Adenosine release during seizures attenuates GABAA receptor-mediated depolarization. *J. Neurosci.* *32*, 5321–5332.

Illes, P., and Rubini, P. (2017). Regulation of neural stem/progenitor cell functions by P2X and P2Y receptors. *Neural Regen Res* *12*, 395–396.

Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., and Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* *61*, 1320–1330.

Itagaki, S., McGeer, P.L., and Akiyama, H. (1988). Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci. Lett.* *91*, 259–264.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* *142*, 387–397.

Iwase, K., Ishihara, A., Yoshimura, S., Andoh, Y., Kato, M., Seki, N., Matsumoto, E., Hiwasa, T., Muller, D., Fukunaga, K., et al. (2014). The secretogranin II gene is a signal integrator of glutamate and dopamine inputs. *Journal of Neurochemistry* *128*, 233–245.

J

Jacobson, K.A., Merighi, S., Varani, K., Borea, P.A., Baraldi, S., Aghazadeh Tabrizi, M., Romagnoli, R., Baraldi, P.G., Ciancetta, A., Tosh, D.K., et al. (2018). A3 Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Med Res Rev* *38*, 1031–1072.

Jakowec, M.W., and Petzinger, G.M. (2004). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. *Comp. Med.* *54*, 497–513.

James, S.D., Hawkins, V.E., Falquetto, B., Ruskin, D.N., Masino, S.A., Moreira, T.S., Olsen, M.L., and Mulkey, D.K. (2018). Adenosine Signaling through A1 Receptors Inhibits Chemosensitive Neurons in the Retrotrapezoid Nucleus. *ENeuro* *5*.

Jang, Y.J., Kim, J., Shim, J., Kim, C.-Y., Jang, J.-H., Lee, K.W., and Lee, H.J. (2013). Decaffeinated coffee prevents scopolamine-induced memory impairment in rats. *Behav. Brain Res.* *245*, 113–119.

Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng.* *17*, 157–165.

- Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., et al. (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*, 159–170.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993a). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* *32*, 4693–4697.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993b). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *695*, 144–148.
- Jarvis, M.F., and Khakh, B.S. (2009). ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* *56*, 208–215.
- Jarvis, M.F., and Williams, M. (1989). Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [3H]CGS 21680. *Eur. J. Pharmacol.* *168*, 243–246.
- Jeganathan, S., Von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2008). The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry* *47*, 10526–10539.
- Jerónimo-Santos, A., Batalha, V.L., Müller, C.E., Baqi, Y., Sebastião, A.M., Lopes, L.V., and Diógenes, M.J. (2014). Impact of in vivo chronic blockade of adenosine A2A receptors on the BDNF-mediated facilitation of LTP. *Neuropharmacology* *83*, 99–106.
- Jho, Y.S., Zhulina, E.B., Kim, M.W., and Pincus, P.A. (2010). Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophysical Journal* *99*, 2387–2397.
- Jiao, S.-S., Shen, L.-L., Zhu, C., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Liu, C.-H., Yao, X.-Q., Zhang, L.-L., Zhou, H.-D., Walker, D.G., et al. (2016a). Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry* *6*, e907–e907.
- Jiao, S.-S., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Zhu, C., Wang, Q.-H., Shen, L.-L., Liu, C.-H., Wang, Y.-R., Yao, X.-Q., and Wang, Y.-J. (2016b). Sex Dimorphism Profile of Alzheimer's Disease-Type Pathologies in an APP/PS1 Mouse Model. *Neurotox Res* *29*, 256–266.
- Jones, L.C., and Scammell, J.G. (1998). The cAMP-response element mediates induction of secretogranin II by CHX and FSK in GH₄C₁ cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* *274*, E656–E664.
- Josephs, K.A., Murray, M.E., Tosakulwong, N., Whitwell, J.L., Knopman, D.S., Machulda, M.M., Weigand, S.D., Boeve, B.F., Kantarci, K., Petrucelli, L., et al. (2017). Tau aggregation influences cognition and hippocampal atrophy in the absence of beta-amyloid: a clinico-imaging-pathological study of primary age-related tauopathy (PART). *Acta Neuropathol.* *133*, 705–715.
- Jucker, M., and Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* *501*, 45–51.

Jurado, S. (2017). AMPA Receptor Trafficking in Natural and Pathological Aging. *Front Mol Neurosci* 10, 446.

K

Kachroo, A., and Schwarzschild, M.A. (2012). Adenosine A2A receptor gene disruption protects in an α -synuclein model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 71, 278–282.

Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Biernat, J., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54, 10347–10351.

Kameyama, K., Lee, H.K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (1998). Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* 21, 1163–1175.

Kandimalla, R., Thirumala, V., and Reddy, P.H. (2017). Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863, 1078–1089.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.

van der Kant, R., and Goldstein, L.S.B. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev. Cell* 32, 502–515.

Karch, C.M., and Goate, A.M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol. Psychiatry* 77, 43–51.

Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H.-M., Nachman, E., Steringer, J.P., Ruiz de Almodovar, C., Nickel, W., and Jahn, T.R. (2018). Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Reports* 23, 2039–2055.

Ke, R.-H., Xiong, J., Liu, Y., and Ye, Z.-R. (2009). Adenosine A2a receptor induced gliosis via Akt/NF-kappaB pathway in vitro. *Neurosci. Res.* 65, 280–285.

Kellogg, E.H., Hejab, N.M.A., Poepsel, S., Downing, K.H., DiMaio, F., and Nogales, E. (2018). Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science* 360, 1242–1246.

Kelly, P.T., Shields, S., Conway, K., Yip, R., and Burgin, K. (1987). Developmental changes in calmodulin-kinase II activity at brain synaptic junctions: alterations in holoenzyme composition. *J. Neurochem.* 49, 1927–1940.

Kelly, R.J., Minogue, A.M., Lyons, A., Jones, R.S., Browne, T.C., Costello, D.A., Denieffe, S., O'Sullivan, C., Connor, T.J., and Lynch, M.A. (2013). Glial Activation in A β PP/PS1 Mice is Associated with Infiltration of IFN γ -Producing Cells. *J. Alzheimers Dis.* 37, 63–75.

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., et al. (2017). A Unique Microglia

Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.e17.

Kerkhofs, A., Canas, P.M., Timmerman, A.J., Heistek, T.S., Real, J.I., Xavier, C., Cunha, R.A., Mansvelder, H.D., and Ferreira, S.G. (2018). Adenosine A2A Receptors Control Glutamatergic Synaptic Plasticity in Fast Spiking Interneurons of the Prefrontal Cortex. *Frontiers in Pharmacology* 9.

Khakh, B.S., and Sofroniew, M. V (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience* 18, 942–952.

Khermesh, K., D'Erchia, A.M., Barak, M., Annese, A., Wachtel, C., Levanon, E.Y., Picardi, E., and Eisenberg, E. (2016). Reduced levels of protein recoding by A-to-I RNA editing in Alzheimer's disease. *RNA* 22, 290–302.

Kibbey, M.C., Jucker, M., Weeks, B.S., Neve, R.L., Van Nostrand, W.E., and Kleinman, H.K. (1993). beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10150–10153.

Kim, D.-G., and Bynoe, M.S. (2015). A2A Adenosine Receptor Regulates the Human Blood-Brain Barrier Permeability. *Mol. Neurobiol.* 52, 664–678.

Kim, D.-G., and Bynoe, M.S. (2016). A2A adenosine receptor modulates drug efflux transporter P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 126, 1717–1733.

Kim, Y.T., and Wu, C.F. (1996). Reduced growth cone motility in cultured neurons from *Drosophila* memory mutants with a defective cAMP cascade. *J. Neurosci.* 16, 5593–5602.

Kim, H.J., Jeon, B.S., and Jenner, P. (2017). Hallmarks of Treatment Aspects: Parkinson's Disease Throughout Centuries Including l-Dopa. *Int. Rev. Neurobiol.* 132, 295–343.

Kim, J., Kleizen, B., Choy, R., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., and Schekman, R.W. (2007). Biogenesis of gamma-secretase early in the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 179, 951–963.

Kim, K.-W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S.A., and Jung, S. (2011). In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 118, e156-167.

Kirk, I.P., and Richardson, P.J. (1995). Further characterization of [3H]-CGS 21680 binding sites in the rat striatum and cortex. *Br. J. Pharmacol.* 114, 537–543.

Knospe, M., Müller, C.E., Rosa, P., Abdelrahman, A., von Kügelgen, I., Thimm, D., and Schiedel, A.C. (2013). The rat adenine receptor: pharmacological characterization and mutagenesis studies to investigate its putative ligand binding site. *Purinergic Signal.* 9, 367–381.

Koenigsknecht-Talboo, J., and Landreth, G.E. (2005). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J. Neurosci.* 25, 8240–8249.

Kong, T., Westerman, K.A., Faigle, M., Eltzhig, H.K., and Colgan, S.P. (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *The FASEB Journal* 20, 2242–2250.

Köpke, E., Tung, Y.C., Shaikh, S., Alonso, A.C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 268, 24374–24384.

Korkutata, M., Saitoh, T., Cherasse, Y., Ioka, S., Duo, F., Qin, R., Murakoshi, N., Fujii, S., Zhou, X., Sugiyama, F., et al. (2019). Enhancing endogenous adenosine A2A receptor signaling induces slow-wave sleep without affecting body temperature and cardiovascular function. *Neuropharmacology* 144, 122–132.

Kowaluk, E.A., and Jarvis, M.F. (2000). Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 551–564.

Kraft, A.W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., Gil, S.C., Brown, J., Wilhelmsson, U., Restivo, J.L., et al. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J.* 27, 187–198.

Kring, D.A., and Cohen, B.A. (2002). Cataclysmic bombardment throughout the inner solar system 3.9–4.0 Ga. *Journal of Geophysical Research: Planets* 107, 4-1-4–6.

Kroll, K., Deussen, A., and Sweet, I.R. (1992). Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S-adenosylhomocysteine in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 71, 590–604.

von Kügelgen, I., and Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 104, 50–61.

Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29, 3020–3032.

Kumar, S., Rezaei-Ghaleh, N., Terwel, D., Thal, D.R., Richard, M., Hoch, M., Mc Donald, J.M., Wüllner, U., Glebov, K., Heneka, M.T., et al. (2011). Extracellular phosphorylation of the amyloid β -peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 30, 2255–2265.

L

Lai, C.-Y., Liu, Y.-J., Lai, H.-L., Chen, H.-M., Kuo, H.-C., Liao, Y.-P., and Chern, Y. (2018). The D2 Dopamine Receptor Interferes With the Protective Effect of the A2A Adenosine Receptor on TDP-43 Mislocalization in Experimental Models of Motor Neuron Degeneration. *Frontiers in Neuroscience* 12.

Lai, W., Wu, J., Zou, X., Xie, J., Zhang, L., Zhao, X., Zhao, M., Wang, Q., and Ji, J. (2013). Secretome analyses of A β (1-42) stimulated hippocampal astrocytes reveal that CXCL10 is involved in astrocyte migration. *J. Proteome Res.* 12, 832–843.

- Lambert, J.-C., and Amouyel, P. (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Current Opinion in Genetics & Development* *21*, 295–301.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). *Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia*. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.
- Langfelder, A., Okonji, E., Deca, D., Wei, W.-C., and Glitsch, M.D. (2015). Extracellular acidosis impairs P2Y receptor-mediated Ca²⁺ signalling and migration of microglia. *Cell Calcium* *57*, 247–256.
- Langmead, B., Schatz, M.C., Lin, J., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Searching for SNPs with cloud computing. *Genome Biol.* *10*, R134.
- Latini, S., Bordoni, F., Pedata, F., and Corradetti, R. (1999). Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* *127*, 729–739.
- Lau, D.H.W., Hogseth, M., Phillips, E.C., O'Neill, M.J., Pooler, A.M., Noble, W., and Hanger, D.P. (2016). Critical residues involved in tau binding to fyn: implications for tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* *4*.
- Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., Hamdane, M., Müller, C.E., Buée, L., et al. (2014). Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiology of Aging* *35*, 2079–2090.
- Laurent, C., Burnouf, S., Ferry, B., Batalha, V.L., Coelho, J.E., Baqi, Y., Malik, E., Mariciniak, E., Parrot, S., Van der Jeugd, A., et al. (2016). A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Molecular Psychiatry* *21*, 97–107.
- Laurent, C., Dorothee, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., Dong, Y., Legeron, F.P., Leboucher, A., Burnouf, S., et al. (2017). Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* *140*, 184–200.
- Lauretti, E., and Praticò, D. (2015). Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase. *Aging Cell* *14*, 1067–1074.
- Lauretti, E., Li, J.G., Di Meco, A., and Praticò, D. (2017). Glucose deficit triggers tau pathology and synaptic dysfunction in a tauopathy mouse model. *Translational Psychiatry* *7*.
- Lazarus, M., Oishi, Y., Bjorness, T.E., and Greene, R.W. (2019). Gating and the Need for Sleep: Dissociable Effects of Adenosine A1 and A2A Receptors. *Front Neurosci* *13*, 740.
- Le, F., Townsend-Nicholson, A., Baker, E., Sutherland, G.R., and Schofield, P.R. (1996). Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor gene: ADORA2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *223*, 461–467.
- LeBlanc, A.C., Xue, R., and Gambetti, P. (1996). Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J. Neurochem.* *66*, 2300–2310.

- Leboucher, A., Ahmed, T., Caron, E., Tailleux, A., Raison, S., Joly-Amado, A., Marciniak, E., Carvalho, K., Hamdane, M., Bantubungi, K., et al. (2019). Brain insulin response and peripheral metabolic changes in a Tau transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease* 125, 14–22.
- Lebouvier, T., Pasquier, F., and Buée, L. (2017). Update on tauopathies: Current Opinion in Neurology 30, 589–598.
- Ledesma, M.D., Correas, I., Avila, J., and Díaz-Nido, J. (1992). Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 308, 218–224.
- Ledesma, M.D., Bonay, P., and Avila, J. (1995). Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J. Neurochem.* 65, 1658–1664.
- Lee, F.S., and Chao, M.V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3555–3560.
- Lee, C.-C., Chang, C.-P., Lin, C.-J., Lai, H.-L., Kao, Y.-H., Cheng, S.-J., Chen, H.-M., Liao, Y.-P., Faivre, E., Buée, L., et al. (2018). Adenosine Augmentation Evoked by an ENT1 Inhibitor Improves Memory Impairment and Neuronal Plasticity in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 8936–8952.
- Lee, H.K., Kameyama, K., Huganir, R.L., and Bear, M.F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21, 1151–1162.
- Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955–959.
- Lee, K.J., Moussa, C.E.H., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B.W., Turner, R.S., Pak, D.T.S., and Hoe, H.S. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* 169, 344–356.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487–1491.
- Leyns, C.E.G., and Holtzman, D.M. (2017). Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Molecular Neurodegeneration* 12, 50.
- Li, C., and Götz, J. (2017). Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *EMBO J.* 36, 3120–3138.
- Li, P., Rial, D., Canas, P.M., Yoo, J.-H., Li, W., Zhou, X., Wang, Y., van Westen, G.J.P., Payen, M.-P., Augusto, E., et al. (2015a). Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. *Molecular Psychiatry* 20, 1339–1349.

- Li, T., Lytle, N., Lan, J.-Q., Sandau, U.S., and Boison, D. (2012). Local disruption of glial adenosine homeostasis in mice associates with focal electrographic seizures: a first step in epileptogenesis? *Glia* 60, 83–95.
- Li, T., Braunstein, K.E., Zhang, J., Lau, A., Sibener, L., Deeble, C., and Wong, P.C. (2016). The neuritic plaque facilitates pathological conversion of tau in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 7, 12082.
- Li, W., Silva, H.B., Real, J., Wang, Y.-M., Rial, D., Li, P., Payen, M.-P., Zhou, Y., Muller, C.E., Tomé, A.R., et al. (2015b). Inactivation of adenosine A2A receptors reverses working memory deficits at early stages of Huntington's disease models. *Neurobiology of Disease* 79, 70–80.
- Li, Y., Liu, L., Barger, S.W., and Griffin, W.S.T. (2003). Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J. Neurosci.* 23, 1605–1611.
- Li, Z., Chen, X., Wang, T., Gao, Y., Li, F., Chen, L., Xue, J., He, Y., Li, Y., Guo, W., et al. (2018). The Corticostriatal Adenosine A2A Receptor Controls Maintenance and Retrieval of Spatial Working Memory. *Biol. Psychiatry* 83, 530–541.
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A.C.-A., Fowler, S.W., Shim, D.J., Rodriguez-Rivera, J., Tagliavola, G., Jankowsky, J.L., et al. (2015). NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85, 101–115.
- Libert, F., Schiffmann, S.N., Lefort, A., Parmentier, M., Gérard, C., Dumont, J.E., Vanderhaeghen, J.J., and Vassart, G. (1991). The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J.* 10, 1677–1682.
- Libert, F., Van Sande, J., Lefort, A., Czernilofsky, A., Dumont, J.E., Vassart, G., Ensinger, H.A., and Mendla, K.D. (1992). Cloning and functional characterization of a human A1 adenosine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 919–926.
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487.
- Liebmann, B., Müller, M., Braun, A., and Brakhage, A.A. (2004). The cyclic AMP-dependent protein kinase a network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 72, 5193–5203.
- Lietsche, J., Imran, I., and Klein, J. (2016). Extracellular levels of ATP and acetylcholine during lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rats. *Neurosci. Lett.* 611, 69–73.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.
- Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y.-W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Ramakrishna, N., and Gong, C.-X. (2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* 22, 3224–3233.

- Liu, G., Zhang, W., Guo, J., Kong, F., Zhou, S., Chen, S., Wang, Z., and Zang, D. (2018a). Adenosine binds predominantly to adenosine receptor A1 subtype in astrocytes and mediates an immunosuppressive effect. *Brain Res.* *1700*, 47–55.
- Liu, Y., Alahiri, M., Ulloa, B., Xie, B., and Sadiq, S.A. (2018b). Adenosine A2A receptor agonist ameliorates EAE and correlates with Th1 cytokine-induced blood brain barrier dysfunction via suppression of MLCK signaling pathway. *Immun Inflamm Dis* *6*, 72–80.
- Löffler, J., and Huber, G. (1992). Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J. Neurochem.* *59*, 1316–1324.
- Loncar, R., Flesche, C.W., and Deussen, A. (1997). Determinants of the S-adenosylhomocysteine (SAH) technique for the local assessment of cardiac free cytosolic adenosine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 1289–1305.
- Londos, C., Cooper, D.M., and Wolff, J. (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *77*, 2551–2554.
- Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 8422–8426.
- Lopatář, J., Dale, N., and Frenguelli, B.G. (2015). Pannexin-1-mediated ATP release from area CA3 drives mGlu5-dependent neuronal oscillations. *Neuropharmacology* *93*, 219–228.
- Lopes, L.V., Cunha, R.A., and Ribeiro, J.A. (1999). Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A2A receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats. *J. Neurochem.* *73*, 1733–1738.
- Lopes, L.V., Cunha, R.A., and Ribeiro, J.A. (2002). Increase in the Number, G Protein Coupling, and Efficiency of Facilitatory Adenosine A2A Receptors in the Limbic Cortex, but not Striatum, of Aged Rats. *Journal of Neurochemistry* *73*, 1733–1738.
- Lorist, M.M., and Tops, M. (2003). Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain Cogn* *53*, 82–94.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* *15*.
- Low, D.Y., Lefèvre-Arbogast, S., González-Domínguez, R., Urpi-Sarda, M., Micheau, P., Petera, M., Centeno, D., Durand, S., Pujos-Guillot, E., Korosi, A., et al. (2019). Diet-Related Metabolites Associated with Cognitive Decline Revealed by Untargeted Metabolomics in a Prospective Cohort. *Mol Nutr Food Res* e1900177.
- Lu, J., Cui, J., Li, X., Wang, X., Zhou, Y., Yang, W., Chen, M., Zhao, J., and Pei, G. (2016). An Anti-Parkinson's Disease Drug via Targeting Adenosine A2A Receptor Enhances Amyloid- β Generation and γ -Secretase Activity. *PLoS ONE* *11*, e0166415.
- Lu, Y., He, H.J., Zhou, J., Miao, J.Y., Lu, J., He, Y.G., Pan, R., Wei, Y., Liu, Y., and He, R.Q. (2013). Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *Journal of Alzheimer's Disease* *37*, 551–563.

Luo, J., Elwood, F., Britschgi, M., Villeda, S., Zhang, H., Ding, Z., Zhu, L., Alabsi, H., Getachew, R., Narasimhan, R., et al. (2013). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *J. Exp. Med.* *210*, 157–172.

Luo, W., Liu, W., Hu, X., Hanna, M., Caravaca, A., and Paul, S.M. (2015). Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci Rep* *5*, 11161.

Luongo, L., Guida, F., Imperatore, R., Napolitano, F., Gatta, L., Cristino, L., Giordano, C., Siniscalco, D., Di Marzo, V., Bellini, G., et al. (2014). The A1 adenosine receptor as a new player in microglia physiology. *Glia* *62*, 122–132.

Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 5113–5117.

Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* *84*, 87–136.

Lynch, G.S., Dunwiddie, T., and Gribkoff, V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* *266*, 737–739.

M

Ma, Q.-L., Yang, F., Rosario, E.R., Ubeda, O.J., Beech, W., Gant, D.J., Chen, P.P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y., et al. (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J. Neurosci.* *29*, 9078–9089.

Maass, A., Landau, S., Baker, S.L., Horng, A., Lockhart, S.N., La Joie, R., Rabinovici, G.D., Jagust, W.J., and Initiative, A.D.N. (2017). Comparison of multiple tau-PET measures as biomarkers in aging and Alzheimer's disease. *NeuroImage* *157*, 448–463.

MacCollin, M., Peterfreund, R., MacDonald, M., Fink, J.S., and Gusella, J. (1994). Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22. *Genomics* *20*, 332–333.

Mackenzie, I.R. (1994). Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging. *Acta Neuropathol.* *87*, 520–525.

MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*.

Madeira, M.H., Boia, R., Elvas, F., Martins, T., Cunha, R.A., Ambrósio, A.F., and Santiago, A.R. (2016). Selective A2A receptor antagonist prevents microglia-mediated neuroinflammation and protects retinal ganglion cells from high intraocular pressure-induced transient ischemic injury. *Transl Res* *169*, 112–128.

Madeira, M.H., Rashid, K., Ambrósio, A.F., Santiago, A.R., and Langmann, T. (2018). Blockade of microglial adenosine A2A receptor impacts inflammatory mechanisms, reduces ARPE-19 cell dysfunction and prevents photoreceptor loss in vitro. *Sci Rep* *8*, 2272.

- Maenhaut, C., Van Sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaegen, J.J., Dumont, J.E., Vassart, G., and Schiffmann, S. (1990). RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *173*, 1169–1178.
- Maezawa, I., Zimin, P.I., Wulff, H., and Jin, L.-W. (2011). Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* *286*, 3693–3706.
- Mahan, L.C., McVittie, L.D., Smyk-Randall, E.M., Nakata, H., Monsma, F.J., Gerfen, C.R., and Sibley, D.R. (1991). Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* *40*, 1–7.
- Maia, L., and de Mendonça, A. (2002). Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.* *9*, 377–382.
- Maina, M.B., Al-Hilaly, Y.K., and Serpell, L.C. (2016). Nuclear tau and its potential role in alzheimer's disease. *Biomolecules* *6*, 2–20.
- Mandelkow, E.M., Thies, E., Trinczek, B., Biernat, J., and Mandelkow, E. (2004). MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *Journal of Cell Biology* *167*, 99–110.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., et al. (1996). Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. *Cell* *87*, 493–506.
- Mango, D., Bonito-Oliva, A., Ledonne, A., Cappellacci, L., Petrelli, R., Nisticò, R., Berretta, N., Fisone, G., and Mercuri, N.B. (2014). Adenosine A1 receptor stimulation reduces D1 receptor-mediated GABAergic transmission from striato-nigral terminals and attenuates l-DOPA-induced dyskinesia in dopamine-denervated mice. *Exp. Neurol.* *261*, 733–743.
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Loyens, A., Talahari, S., Bégard, S., et al. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Scientific Reports* *6*.
- Manthei, S.A., Reiling, C.M., and Van Wylen, D.G. (1998). Dual cardiac microdialysis to assess drug-induced changes in interstitial purine metabolites: adenosine deaminase inhibition versus adenosine kinase inhibition. *Cardiovasc. Res.* *37*, 171–178.
- Manzoni, O.J., Manabe, T., and Nicoll, R.A. (1994). Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* *265*, 2098–2101.
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O.N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T., and Bhaskar, K. (2015). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* *138*, 1738–1755.
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., Issad, T., Gerhardt, E., Pagesy, P., Vilenó, M., et al. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of Experimental Medicine* *214*, 2257–2269.

- Martin, E., Amar, M., Dalle, C., Youssef, I., Boucher, C., Le Duigou, C., Brückner, M., Prigent, A., Szadovitch, V., Halle, A., et al. (2019). New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Psychiatry* *24*, 108–125.
- Mathys, H., Adaikkan, C., Gao, F., Young, J.Z., Manet, E., Hemberg, M., De Jager, P.L., Ransohoff, R.M., Regev, A., and Tsai, L.-H. (2017). Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep* *21*, 366–380.
- Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J.Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., et al. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*.
- Matos, M., Augusto, E., Santos-Rodrigues, A.D., Schwarzschild, M.A., Chen, J.-F., Cunha, R.A., and Agostinho, P. (2012a). Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. *Glia* *60*, 702–716.
- Matos, M., Augusto, E., Machado, N.J., dos Santos-Rodrigues, A., Cunha, R.A., and Agostinho, P. (2012b). Astrocytic Adenosine A2A Receptors Control the Amyloid- β Peptide-Induced Decrease of Glutamate Uptake. *Journal of Alzheimer's Disease* *31*, 555–567.
- Matos, M., Augusto, E., Agostinho, P., Cunha, R.A., and Chen, J.-F. (2013). Antagonistic Interaction between Adenosine A2A Receptors and Na⁺/K⁺-ATPase- 2 Controlling Glutamate Uptake in Astrocytes. *Journal of Neuroscience* *33*, 18492–18502.
- Matos, M., Shen, H.-Y., Augusto, E., Wang, Y., Wei, C.J., Wang, Y.T., Agostinho, P., Boison, D., Cunha, R.A., and Chen, J.-F. (2015). Deletion of Adenosine A2A Receptors From Astrocytes Disrupts Glutamate Homeostasis Leading to Psychomotor and Cognitive Impairment: Relevance to Schizophrenia. *Biological Psychiatry* *78*, 763–774.
- Matusch, A., Saft, C., Elmenhorst, D., Kraus, P.H., Gold, R., Hartung, H.-P., and Bauer, A. (2014). Cross sectional PET study of cerebral adenosine A₁ receptors in premanifest and manifest Huntington's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *41*, 1210–1220.
- Matyash, M., Zabiegalov, O., Wendt, S., Matyash, V., and Kettenmann, H. (2017). The adenosine generating enzymes CD39/CD73 control microglial processes ramification in the mouse brain. *PLoS ONE* *12*, e0175012.
- McAdoo, D.J., Robak, G., Xu, G.Y., and Hughes, M.G. (2000). Adenosine release upon spinal cord injury. *Brain Res.* *854*, 152–157.
- McColgan, P., and Tabrizi, S.J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* *25*, 24–34.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* *102*, 527–540.
- Melani, A., Pantoni, L., Corsi, C., Bianchi, L., Monopoli, A., Bertorelli, R., Pepeu, G., and Pedata, F. (1999). Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke* *30*, 2448–2454; discussion 2455.

- Melani, A., Turchi, D., Vannucchi, M.G., Cipriani, S., Gianfriddo, M., and Pedata, F. (2005). ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem. Int.* *47*, 442–448.
- Meraz-Ríos, M.A., Franco-Bocanegra, D., Toral Rios, D., and Campos-Peña, V. (2014). Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* *2014*, 375968.
- Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015a). Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* *6*.
- Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015b). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* *6*.
- Metuzals, J., Robitaille, Y., Houghton, S., Gauthier, S., and Leblanc, R. (1988). Paired helical filaments and the cytoplasmic-nuclear interface in Alzheimer's disease. *Journal of Neurocytology* *17*, 827–833.
- Mievis, S., Blum, D., and Ledent, C. (2011). A2A receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* *41*, 570–576.
- Mileusnic, R., Lancashire, C.L., Johnston, A.N., and Rose, S.P. (2000). APP is required during an early phase of memory formation. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 4487–4495.
- Miller, R.H., and Raff, M.C. (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J. Neurosci.* *4*, 585–592.
- Mills, J.H., Alabanza, L.M., Mahamed, D.A., and Bynoe, M.S. (2012). Extracellular adenosine signaling induces CX3CL1 expression in the brain to promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* *9*, 193.
- Minghetti, L., Greco, A., Potenza, R.L., Pezzola, A., Blum, D., Bantubungi, K., and Popoli, P. (2007). Effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58621 on cyclooxygenase-2 expression, glial activation, and brain-derived neurotrophic factor availability in a rat model of striatal neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *66*, 363–371.
- Misawa, H., Matsuura, J., Oda, Y., Takahashi, R., and Deguchi, T. (1997). Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5X-region produce a 69-kDa major translation product. *11*.
- Misumi, Y., Ogata, S., Ohkubo, K., Hirose, S., and Ikehara, Y. (1990). Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur. J. Biochem.* *191*, 563–569.
- Miyasaka, T., Watanabe, A., Saito, Y., Murayama, S., Mann, D.M.A., Yamazaki, M., Ravid, R., Morishima-Kawashima, M., Nagashima, K., and Ihara, Y. (2005). Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 665–674.
- Miyazaki, T., Yamasaki, M., Uchigashima, M., Matsushima, A., and Watanabe, M. (2011). Cellular expression and subcellular localization of secretogranin II in the mouse hippocampus

and cerebellum: SgII localization in the hippocampus & cerebellum. *European Journal of Neuroscience* 33, 82–94.

Mizuno, T. (2012). The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 737846.

Molina-Arcas, M., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2009). Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* 7, 426–434.

Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by *N*-Methyl-d-aspartate Receptor-dependent Tau Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 287, 32040–32053.

Monitto, C.L., Levitt, R.C., DiSilvestre, D., and Holroyd, K.J. (1995). Localization of the A3 adenosine receptor gene (ADORA3) to human chromosome 1p. *Genomics* 26, 637–638.

Montero, T.D., and Orellana, J.A. (2015). Hemichannels: New pathways for gliotransmitter release. *Neuroscience* 286, 45–59.

Moonga, I., Niccolini, F., Wilson, H., Pagano, G., Politis, M., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2017). Hypertension is associated with worse cognitive function and hippocampal hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 24, 1173–1182.

Morales, I., Jiménez, J.M., Mancilla, M., and Maccioni, R.B. (2013). Tau Oligomers and Fibrils Induce Activation of Microglial Cells. *Journal of Alzheimer's Disease* 37, 849–856.

Morin, N., Morissette, M., Grégoire, L., and Di Paolo, T. (2016). mGlu5, Dopamine D₂ and Adenosine A_{2A} Receptors in L-DOPA-induced Dyskinesias. *Current Neuropharmacology* 14, 481–493.

Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., and Ihara, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging* 16, 365–371; discussion 371–380.

Moriyama, K., and Sitkovsky, M.V. (2010). Adenosine A_{2A} receptor is involved in cell surface expression of A_{2B} receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 39271–39288.

Morris, M., Knudsen, G.M., Maeda, S., Trinidad, J.C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A.L., and Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 18, 1183–1189.

Mosconi, L., Pupi, A., and De Leon, M.J. (2008). Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 180–195.

Mukandala, G., Tynan, R., Lanigan, S., and O'Connor, J.J. (2016). The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. *Brain Sci* 6.

Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution. *PLoS Biology* 7, 0399–0414.

Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369, 486–488.

Müller, U.C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 281–298.

Muntané, G., Dalfó, E., Martínez, A., and Ferrer, I. (2008). Phosphorylation of tau and alpha-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies. *Neuroscience* 152, 913–923.

Murray, C.A., and Lynch, M.A. (1998). Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 18, 2974–2981.

Murrison, E., Goodson, S.J., Harris, C.A., and Edbrooke, M.R. (1995). The human A3 adenosine receptor gene. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 270S.

Musiek, E.S., and Holtzman, D.M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen.” *Nature Neuroscience* 18, 800–806.

Mustard, J.A. (2014). The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1375–1382.

N

Nagpure, B.V., and Bian, J.-S. (2014). Hydrogen sulfide inhibits A2A adenosine receptor agonist induced β -amyloid production in SH-SY5Y neuroblastoma cells via a cAMP dependent pathway. *PLoS ONE* 9, e88508.

Naudé, P.J.W., Nyakas, C., Eiden, L.E., Ait-Ali, D., van der Heide, R., Engelborghs, S., Luiten, P.G.M., De Deyn, P.P., den Boer, J.A., and Eisel, U.L.M. (2012). Lipocalin 2: novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 26, 2811–2823.

Neary, J.T., Shi, Y.-F., Kang, Y., and Tran, M.D. (2008). Opposing effects of P2X(7) and P2Y purine/pyrimidine-preferring receptors on proliferation of astrocytes induced by fibroblast growth factor-2: implications for CNS development, injury, and repair. *J. Neurosci. Res.* 86, 3096–3105.

zur Nedden, S., Doney, A.S., and Frenguelli, B.G. (2014). Modulation of intracellular ATP determines adenosine release and functional outcome in response to metabolic stress in rat hippocampal slices and cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 128, 111–124.

Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387, 271–280.

Newell, E.A., Exo, J.L., Verrier, J.D., Jackson, T.C., Gillespie, D.G., Janesko-Feldman, K., Kochanek, P.M., and Jackson, E.K. (2015). 2',3'-cAMP, 3'-AMP, 2'-AMP and adenosine

inhibit TNF- α and CXCL10 production from activated primary murine microglia via A2A receptors. *Brain Res.* 1594, 27–35.

Nicoll, J.A.R., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 9, 448–452.

Nilson, A.N., English, K.C., Gerson, J.E., Barton Whittle, T., Nicolas Crain, C., Xue, J., Sengupta, U., Castillo-Carranza, D.L., Zhang, W., Gupta, P., et al. (2017). Tau Oligomers Associate with Inflammation in the Brain and Retina of Tauopathy Mice and in Neurodegenerative Diseases. *J. Alzheimers Dis.* 55, 1083–1099.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.

Nobre, H.V., Cunha, G.M. de A., de Vasconcelos, L.M., Magalhães, H.I.F., Oliveira Neto, R.N., Maia, F.D., de Moraes, M.O., Leal, L.K.A.M., and Viana, G.S. de B. (2010). Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem. Int.* 56, 51–58.

North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067.

O

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 29, 547–553.

Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J. Neurosci.* 29, 3276–3287.

Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Rodríguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., and Olanow, C.W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, S8-19.

O'Connor, S.E., Dainty, I.A., and Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 137–141.

Oertel, W., and Schulz, J.B. (2016). Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J. Neurochem.* 139 Suppl 1, 325–337.

Ogawa, Y., Furusawa, E., Saitoh, T., Sugimoto, H., Omori, T., Shimizu, S., Kondo, H., Yamazaki, M., Sakuraba, H., and Oishi, K. (2018). Inhibition of astrocytic adenosine receptor A2A attenuates microglial activation in a mouse model of Sandhoff disease. *Neurobiology of Disease* 118, 142–154.

Oishi, Y., Xu, Q., Wang, L., Zhang, B.-J., Takahashi, K., Takata, Y., Luo, Y.-J., Cherasse, Y., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., et al. (2017). Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. *Nat Commun* 8, 734.

Okello, A., Edison, P., Archer, H.A., Turkheimer, F.E., Kennedy, J., Bullock, R., Walker, Z., Kennedy, A., Fox, N., Rossor, M., et al. (2009). Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: a PET study. *Neurology* 72, 56–62.

Orellana, J.A., Moraga-Amaro, R., Díaz-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C.J., Stehberg, J., and Sáez, J.C. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front Cell Neurosci* 9, 102.

Ormond, S.J., Barrera, N.P., Qureshi, O.S., Henderson, R.M., Edwardson, J.M., and Murrell-Lagnado, R.D. (2006). An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 69, 1692–1700.

Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.-J., Gross, R.E., and Traynelis, S.F. (2009). Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nature Neuroscience* 12, 872–878.

Orr, A.G., Hsiao, E.C., Wang, M.M., Ho, K., Kim, D.H., Wang, X., Guo, W., Kang, J., Yu, G.Q., Adame, A., et al. (2015). Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci* 18, 423–434.

Orr, A.G., Lo, I., Schumacher, H., Ho, K., Gill, M., Guo, W., Kim, D.H., Knox, A., Saito, T., Saido, T.C., et al. (2018). Istradefylline reduces memory deficits in aging mice with amyloid pathology. *Neurobiology of Disease* 110, 29–36.

Osenkowski, P., Li, H., Ye, W., Li, D., Aeschbach, L., Fraering, P.C., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., and Li, H. (2009). Cryoelectron microscopy structure of purified gamma-secretase at 12 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 385, 642–652.

Othman, T., Yan, H., and Rivkees, S.A. (2003). Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia* 44, 166–172.

Ouyang, X., Ghani, A., Malik, A., Wilder, T., Colegio, O.R., Flavell, R.A., Cronstein, B.N., and Mehal, W.Z. (2013). Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A₂A receptor and the HIF-1 α pathway. *Nat Commun* 4, 2909.

P

Pagnussat, N., Almeida, A.S., Marques, D.M., Nunes, F., Chenet, G.C., Botton, P.H.S., Mioranza, S., Loss, C.M., Cunha, R.A., and Porciúncula, L.O. (2015). Adenosine A(2A) receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3831–3845.

Pan, X.-D., Zhu, Y.-G., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q.-Y., Huang, H.-P., and Chen, X.-C. (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6, 45.

Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* 125, 775–784.

- Panda, D., Samuel, J.C., Massie, M., Feinstein, S.C., and Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 9548–9553.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* *155*, 1596–1609.
- Pascual, O. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* *310*, 113–116.
- Penke, B., Bogár, F., and Fülöp, L. (2017). β -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules* *22*.
- Perea, J.R., Llorens-Martín, M., Ávila, J., and Bolós, M. (2018). The Role of Microglia in the Spread of Tau: Relevance for Tauopathies. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *12*, 172.
- Perea, J.R., López, E., Díez-Ballesteros, J.C., Ávila, J., Hernández, F., and Bolós, M. (2019). Extracellular Monomeric Tau Is Internalized by Astrocytes. *Front Neurosci* *13*, 442.
- Pereira, G.S., Rossato, J.I., Sarkis, J.J.F., Cammarota, M., Bonan, C.D., and Izquierdo, I. (2005). Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiol Learn Mem* *83*, 217–223.
- Perez, M., Santa-Maria, I., De Barreda, E.G., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J.R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Perry, G., et al. (2009). Tau - An inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *Journal of Neurochemistry* *109*, 1756–1766.
- Perrier, S.P., Gleizes, M., Fonta, C., and Nowak, L.G. (2019). Effect of adenosine on short-term synaptic plasticity in mouse piriform cortex in vitro: adenosine acts as a high-pass filter. *Physiol Rep* *7*, e13992.
- Peterfreund, R.A., MacCollin, M., Gusella, J., and Fink, J.S. (1996). Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J. Neurochem.* *66*, 362–368.
- Philips, T., and Rothstein, J.D. (2017). Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J. Clin. Invest.* *127*, 3271–3280.
- Piacentini, R., Li Puma, D.D., Mainardi, M., Lazzarino, G., Tavazzi, B., Arancio, O., and Grassi, C. (2017). Reduced gliotransmitter release from astrocytes mediates tau-induced synaptic dysfunction in cultured hippocampal neurons. *Glia* *65*, 1302–1316.
- Picher, M., Burch, L.H., and Boucher, R.C. (2004). Metabolism of P2 receptor agonists in human airways: implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 20234–20241.
- Pierce, K.D., Furlong, T.J., Selbie, L.A., and Shine, J. (1992). Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *187*, 86–93.

- Pinheiro, S., Silva, J., Mota, C., Vaz-Silva, J., Veloso, A., Pinto, V., Sousa, N., Cerqueira, J., and Sotiropoulos, I. (2016). Tau Mislocation in Glucocorticoid-Triggered Hippocampal Pathology. *Molecular Neurobiology* 53, 4745–4753.
- Pinna, A., Serra, M., Morelli, M., and Simola, N. (2018). Role of adenosine A2A receptors in motor control: relevance to Parkinson's disease and dyskinesia. *Journal of Neural Transmission* 125, 1273–1286.
- Pitkänen, A., and Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 10, 173–186.
- Planel, E. (2004). Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* 24, 2401–2411.
- Plescher, M., Seifert, G., Hansen, J.N., Bedner, P., Steinhäuser, C., and Halle, A. (2018). Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 66, 1464–1480.
- Polanco, J.C., Scicluna, B.J., Hill, A.F., and Götz, J. (2016). Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 291, 12445–12466.
- Pontecorvo, M.J., Devous, M.D., Kennedy, I., Navitsky, M., Lu, M., Galante, N., Salloway, S., Doraiswamy, P.M., Southekal, S., Arora, A.K., et al. (2019). A multicentre longitudinal study of flortaucipir (18F) in normal ageing, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia. *Brain*.
- Pooler, A.M., Phillips, E.C., Lau, D.H.W., Noble, W., and Hanger, D.P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Reports* 14, 389–394.
- Popoli, P., Reggιο, R., Pèzzola, A., Fuxe, K., and Ferré, S. (1998). Adenosine A1 and A2A receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. *Neurosci. Lett.* 251, 201–204.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W., and McCarley, R.W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265–1268.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., and McCarley, R.W. (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 99, 507–517.
- Prasanthi, J.R.P., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J.D., and Ghribi, O. (2010). Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1212–1220.
- Puzzo, D., Piacentini, R., Fá, M., Gulisano, W., Li Puma, D.D., Staniszewski, A., Zhang, H., Tropea, M.R., Cocco, S., Palmeri, A., et al. (2017). LTP and memory impairment caused by extracellular A β and Tau oligomers is APP-dependent. *Elife* 6.

Q

Qi, H., Cantrelle, F.-X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buée, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.-C., and Landrieu, I. (2015). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation. *Biochemistry* 54, 1525–1533.

Querol-Vilaseca, M., Colom-Cadena, M., Pegueroles, J., San Martín-Paniello, C., Clarimon, J., Belbin, O., Fortea, J., and Lleó, A. (2017). YKL-40 (Chitinase 3-like I) is expressed in a subset of astrocytes in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Journal of Neuroinflammation* 14.

R

Rajendran, L., Bali, J., Barr, M.M., Court, F.A., Krämer-Albers, E.-M., Picou, F., Raposo, G., van der Vos, K.E., van Niel, G., Wang, J., et al. (2014). Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *J. Neurosci.* 34, 15482–15489.

Ramanan, V.K., Risacher, S.L., Nho, K., Kim, S., Shen, L., McDonald, B.C., Yoder, K.K., Hutchins, G.D., West, J.D., Tallman, E.F., et al. (2015). GWAS of longitudinal amyloid accumulation on 18F-florbetapir PET in Alzheimer's disease implicates microglial activation gene IL1RAP. *Brain* 138, 3076–3088.

Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6364–6369.

Rascol, O., Perez-Lloret, S., and Ferreira, J.J. (2015). New treatments for levodopa-induced motor complications. *Mov. Disord.* 30, 1451–1460.

Rebola, N., Sebastião, A.M., de Mendonca, A., Oliveira, C.R., Ribeiro, J.A., and Cunha, R.A. (2003). Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *J. Neurophysiol.* 90, 1295–1303.

Rebola, N., Canas, P.M., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2005a). Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience* 132, 893–903.

Rebola, N., Rodrigues, R.J., Lopes, L.V., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2005b). Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience* 133, 79–83.

Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R.A., and Mulle, C. (2008). Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* 57, 121–134.

Rebola, N., Simões, A.P., Canas, P.M., Tomé, A.R., Andrade, G.M., Barry, C.E., Agostinho, P.M., Lynch, M.A., and Cunha, R.A. (2011). Adenosine A2A receptors control

neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction: A2A receptors control neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry* 117, 100–111.

Reichenbach, N., Delekate, A., Breithausen, B., Keppler, K., Poll, S., Schulte, T., Peter, J., Plescher, M., Hansen, J.N., Blank, N., et al. (2018). P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer's disease model. *The Journal of Experimental Medicine* 215, 1649–1663.

Reiss, A.B., Arain, H.A., Stecker, M.M., Siegart, N.M., and Kasselmann, L.J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 29, 613–627.

Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology* 88, 640–651.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Stehle, J.H., and Rivkees, S.A. (1991). Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol. Endocrinol.* 5, 1037–1048.

Ribeiro, F.F., Xapelli, S., Miranda-Lourenço, C., Tanqueiro, S.R., Fonseca-Gomes, J., Diógenes, M.J., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (2016). Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* 104, 226–242.

Ritchie, K., Carrière, I., de Mendonca, A., Portet, F., Dartigues, J.F., Rouaud, O., Barberger-Gateau, P., and Ancelin, M.L. (2007). The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69, 536–545.

Rivera, A., Vanzulli, I., and Butt, A.M. (2016). A Central Role for ATP Signalling in Glial Interactions in the CNS. *Curr Drug Targets* 17, 1829–1833.

Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science (New York, N.Y.)* 316, 750–754.

Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.-Q., et al. (2011). Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 700–711.

Rocha, E.M., De Miranda, B., and Sanders, L.H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 109, 249–257.

Rodrigues, R.J., Marques, J.M., and Cunha, R.A. (2018). Purinergic signalling and brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.*

Rodríguez-Martín, T., Pooler, A.M., Lau, D.H.W., Mórotz, G.M., De Vos, K.J., Gilley, J., Coleman, M.P., and Hanger, D.P. (2016). Reduced number of axonal mitochondria and tau hypophosphorylation in mouse P301L tau knockin neurons. *Neurobiology of Disease* 85, 1–10.

- Rogers, J., Lubner-Narod, J., Styren, S.D., and Civin, W.H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 9, 339–349.
- Rombo, D.M., Newton, K., Nissen, W., Badurek, S., Horn, J.M., Minichiello, L., Jefferys, J.G.R., Sebastiao, A.M., and Lamsa, K.P. (2015). Synaptic mechanisms of adenosine A2A receptor-mediated hyperexcitability in the hippocampus. *Hippocampus* 25, 566–580.
- Rosemeyer, H. (2004). The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chem. Biodivers.* 1, 361–401.
- Rosenberg, R.N., Lambrecht-Washington, D., Yu, G., and Xia, W. (2016). Genomics of Alzheimer Disease: A Review. *JAMA Neurol* 73, 867–874.
- Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G., and Linden, J. (1998). Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 401, 163–186.
- Rosin, D.L., Hettinger, B.D., Lee, A., and Linden, J. (2003). Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. *Neurology* 61, S12-18.
- Rossi, G., Conconi, D., Panzeri, E., Redaelli, S., Piccoli, E., Paoletta, L., Dalprà, L., and Tagliavini, F. (2013). Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome. *Journal of Alzheimer's Disease* 33, 969–982.
- Roth, K., and Weiner, M.W. (1991). Determination of cytosolic ADP and AMP concentrations and the free energy of ATP hydrolysis in human muscle and brain tissues with ³¹P NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 22, 505–511.
- Rothhammer, V., and Quintana, F.J. (2015). Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Seminars in Immunopathology* 37, 625–638.

S

- Sajjadi, F.G., and Firestein, G.S. (1993). cDNA cloning and sequence analysis of the human A3 adenosine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 105–107.
- Sala-Newby, G.B., Skladanowski, A.C., and Newby, A.C. (1999). The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. *J. Biol. Chem.* 274, 17789–17793.
- Salvatore, C.A., Jacobson, M.A., Taylor, H.E., Linden, J., and Johnson, R.G. (1993). Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10365–10369.
- Samways, D.S.K., Li, Z., and Egan, T.M. (2014). Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 8, 6.

- Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M., Sanchez-Varo, R., Nuñez-Diaz, C., Trujillo-Estrada, L., Davila, J.C., Vizuete, M., Gutierrez, A., et al. (2016). Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathologica* 132, 897–916.
- Sanders, D.W., Kaufman, S.K., DeVos, S.L., Sharma, A.M., Mirbaha, H., Li, A., Barker, S.J., Foley, A.C., Thorpe, J.R., Serpell, L.C., et al. (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82, 1271–1288.
- Santos, C., Costa, J., Santos, J., Vaz-Carneiro, A., and Lunet, N. (2010). Caffeine intake and dementia: systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimers Dis.* 20 Suppl 1, S187-204.
- Saul, A., Hausmann, R., Kless, A., and Nicke, A. (2013). Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci* 7.
- Saura, C.A., Parra-Damas, A., and Enriquez-Barreto, L. (2015). Gene expression parallels synaptic excitability and plasticity changes in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 9, 318.
- Sawyer, D.A., Julia, H.L., and Turin, A.C. (1982). Caffeine and human behavior: arousal, anxiety, and performance effects. *J Behav Med* 5, 415–439.
- Scheele, C.W. (1776). *Examen Chemicum Calculi Urinari* [A chemical examination of kidney stones]. *Opuscula* 73.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., and Van der Flier, W.M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet* 388, 505–517.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A., and Ferré, S. (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 83, 277–292.
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Begard, S., Brion, J.P., Hamdane, M., and Buee, L. (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, 599–616.
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Funke, S.A., Schilling, S., and Demuth, H.-U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48, 7072–7078.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., and Souza, D.O. (2007). Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacology & Therapeutics* 116, 401–416.
- Scholz, W.K., Baitinger, C., Schulman, H., and Kelly, P.T. (1988). Developmental changes in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cultures of hippocampal pyramidal neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 8, 1039–1051.
- Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231. *Structure* 23, 1448–1458.

- Schwarz, A.J., Yu, P., Miller, B.B., Shcherbinin, S., Dickson, J., Navitsky, M., Joshi, A.D., Devous, M.D., and Mintun, M.S. (2016). Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. *Brain: A Journal of Neurology* 139, 1539–1550.
- Schwiebert, E.M., and Zsembery, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1615, 7–32.
- Seabrook, G.R., Smith, D.W., Bowery, B.J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Zheng, H., Dawson, G.R., Sirinathsinghji, D.J., et al. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38, 349–359.
- Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (1992). Evidence for the presence of excitatory A2 adenosine receptors in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 138, 41–44.
- Seifert, R., and Schultz, G. (1989). Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 365–369.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1998). Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, 299–309.
- Sergeant, N., Wattez, A., and Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively “exon 10” isoforms. *Journal of Neurochemistry* 72, 1243–1249.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer’s disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5, 207–224.
- Shaftel, S.S., Griffin, W.S.T., and O’Banion, M.K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 5, 7.
- Sharma, B., and Paul, S. (2016). Action of Caffeine as an Amyloid Inhibitor in the Aggregation of A β 16-22 Peptides. *J Phys Chem B* 120, 9019–9033.
- Shigematsu, K., McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (1992). Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons. *Brain Res.* 592, 353–357.
- Shindou, T., Nonaka, H., Richardson, P.J., Mori, A., Kase, H., and Ichimura, M. (2002). Presynaptic adenosine A2A receptors enhance GABAergic synaptic transmission via a cyclic AMP dependent mechanism in the rat globus pallidus. *Br. J. Pharmacol.* 136, 296–302.
- Shipton, O.A., Leitz, J.R., Dworzak, J., Acton, C.E.J., Tunbridge, E.M., Denk, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Wade-Martins, R., Paulsen, O., et al. (2011). Tau Protein Is Required for Amyloid -Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience* 31, 1688–1692.

Shrivastava, A.N., Redeker, V., Pieri, L., Bousset, L., Renner, M., Madiona, K., Mailhes-Hamon, C., Coens, A., Buée, L., Hantraye, P., et al. (2019). Clustering of Tau fibrils impairs the synaptic composition of α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and AMPA receptors. *EMBO J.* 38.

Sibille, N., Huvent, I., Fauquant, C., Verdegem, D., Amniai, L., Leroy, A., Wieruszeski, J.M., Lippens, G., and Landrieu, I. (2012). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 80, 454–462.

Silva, A.C., Lemos, C., Gonçalves, F.Q., Pliássova, A.V., Machado, N.J., Silva, H.B., Canas, P.M., Cunha, R.A., Lopes, J.P., and Agostinho, P. (2018). Blockade of adenosine A_{2A} receptors recovers early deficits of memory and plasticity in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 117, 72–81.

Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201–206.

Simpson, J.E., Ince, P.G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P.J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., and Wharton, S.B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging* 31, 578–590.

Singh, T.J., Wang, J.Z., Novak, M., Kontzekova, E., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett.* 387, 145–148.

Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., Wu, W.Q., Chauhan, V., Novak, M., Kontzekova, E., and Iqbal, K. (1997). Protein kinase C and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate three-repeat and four-repeat tau isoforms at different rates. *Mol. Cell. Biochem.* 168, 141–148.

Sironi, J.J., Yen, S.H., Gondal, J.A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1998). Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett.* 436, 471–475.

Sjoberg, M.K. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *Journal of Cell Science* 119, 2025–2034.

Smit, H.J., and Rogers, P.J. (2000). Effects of low doses of caffeine on cognitive performance, mood and thirst in low and higher caffeine consumers. *Psychopharmacology (Berl.)* 152, 167–173.

Smith, D.H. (2009). Stretch growth of integrated axon tracts: Extremes and exploitations. *Prog Neurobiol* 89, 231–239.

Smith, N.A., Bekar, L.K., and Nedergaard, M. (2019). Astrocytic Endocannabinoids Mediate Hippocampal Transient Heterosynaptic Depression. *Neurochem. Res.*

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119, 7–35.

Sokolow, S., Henkins, K.M., Bilousova, T., Gonzalez, B., Vinters, H.V., Miller, C.A., Cornwell, L., Poon, W.W., and Gylys, K.H. (2015). Pre-synaptic C-terminal truncated tau is

released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 133, 368–379.

Spangenberg, E.E., Lee, R.J., Najafi, A.R., Rice, R.A., Elmore, M.R.P., Blurton-Jones, M., West, B.L., and Green, K.N. (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain* 139, 1265–1281.

Spellman, D.S., Wildsmith, K.R., Honigberg, L.A., Tuefferd, M., Baker, D., Raghavan, N., Nairn, A.C., Croteau, P., Schirm, M., Allard, R., et al. (2015). Development and evaluation of a multiplexed mass spectrometry based assay for measuring candidate peptide biomarkers in Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) CSF. *PROTEOMICS - Clinical Applications* 9, 715–731.

Spillantini, M.G., Bird, T.D., and Ghetti, B. (1998a). Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 8, 387–402.

Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998b). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7737–7741.

Srinivasan, K., Friedman, B.A., Larson, J.L., Lauffer, B.E., Goldstein, L.D., Appling, L.L., Borneo, J., Poon, C., Ho, T., Cai, F., et al. (2016). Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses. *Nat Commun* 7, 11295.

Stancu, I.-C., Cremers, N., Vanrusselt, H., Couturier, J., Vanoosthuysse, A., Kessels, S., Lodder, C., Brône, B., Huaux, F., Octave, J.-N., et al. (2019). Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo. *Acta Neuropathol.* 137, 599–617.

Staubli, U., and Scafidi, J. (1997). Studies on long-term depression in area CA1 of the anesthetized and freely moving rat. *J. Neurosci.* 17, 4820–4828.

Stephan, A.H., Madison, D.V., Mateos, J.M., Fraser, D.A., Lovelett, E.A., Coutellier, L., Kim, L., Tsai, H.-H., Huang, E.J., Rowitch, D.H., et al. (2013). A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. *J. Neurosci.* 33, 13460–13474.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 286, 4566–4575.

Sultan, S., Li, L., Moss, J., Petrelli, F., Cassé, F., Gebara, E., Lopatar, J., Pfrieger, F.W., Bezzi, P., Bischofberger, J., et al. (2015). Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron* 88, 957–972.

Suzuki, M., and Kimura, T. (2017). Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways. *Neuroscience Letters* 653, 276–282.

Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., et al. (2017). The STRING database in 2017: quality-

controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* *45*, D362–D368.

T

Tai, H.-C., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M.P., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2012). The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *The American Journal of Pathology* *181*, 1426–1435.

Takahashi, R.H., Nagao, T., and Gouras, G.K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol. Int.* *67*, 185–193.

Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M.W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A.E., et al. (2013). $A\beta$ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, E2518-2527.

Tancredi, V., D'Arcangelo, G., Grassi, F., Tarroni, P., Palmieri, G., Santoni, A., and Eusebi, F. (1992). Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* *146*, 176–178.

Tancredi, V., D'Antuono, M., Cafè, C., Giovedì, S., Buè, M.C., D'Arcangelo, G., Onofri, F., and Benfenati, F. (2000). The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J. Neurochem.* *75*, 634–643.

Taneo, J., Adachi, T., Yoshida, A., Takayasu, K., Takahara, K., and Inaba, K. (2015). Amyloid β oligomers induce interleukin-1 β production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *458*, 561–567.

Tang, Y., and Illes, P. (2017). Regulation of adult neural progenitor cell functions by purinergic signaling. *Glia* *65*, 213–230.

Tardivel, M., Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., Buée, L., and Colin, M. (2016). Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathologica Communications* *4*.

Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., and Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* *8*, 2797–2801.

Tatebayashi, Y., Haque, N., Tung, Y.-C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2004). Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of organelle transport. *Journal of Cell Science* *117*, 1653–1663.

Tebano, M.T., Martire, A., Potenza, R.L., Grò, C., Pepponi, R., Armida, M., Domenici, M.R., Schwarzschild, M.A., Chen, J.F., and Popoli, P. (2008). Adenosine A(2A) receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* *104*, 279–286.

- Tejera, D., Mercan, D., Sanchez-Caro, J.M., Hanan, M., Greenberg, D., Soreq, H., Latz, E., Golenbock, D., and Heneka, M.T. (2019). Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP3 inflammasome. *EMBO J.* e101064.
- Temido-Ferreira, M., Ferreira, D.G., Batalha, V.L., Marques-Morgado, I., Coelho, J.E., Pereira, P., Gomes, R., Pinto, A., Carvalho, S., Canas, P.M., et al. (2018). Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. *Mol. Psychiatry.*
- Tetzlaff, W., Schubert, P., and Kreutzberg, G.W. (1987). Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience* 21, 869–875.
- Teune, L.K., Bartels, A.L., de Jong, B.M., Willemsen, A.T.M., Eshuis, S.A., de Vries, J.J., van Oostrom, J.C.H., and Leenders, K.L. (2010). Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 25, 2395–2404.
- Thal, D.R., Rüb, U., Schultz, C., Sassin, I., Ghebremedhin, E., Del Tredici, K., Braak, E., and Braak, H. (2000). Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 733–748.
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800.
- Thal, D.R., Walter, J., Saido, T.C., and Fändrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 129, 167–182.
- Thimm, D., Knospe, M., Abdelrahman, A., Moutinho, M., Alsdorf, B.B.A., von Kügelgen, I., Schiedel, A.C., and Müller, C.E. (2013). Characterization of new G protein-coupled adenosine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal.* 9, 415–426.
- Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619.
- Thornton, C., Bright, N.J., Sastre, M., Muckett, P.J., and Carling, D. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure. *Biochemical Journal* 434, 503–512.
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K., and Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 124, 83–92.
- Tokutake, T., Kasuga, K., Yajima, R., Sekine, Y., Tezuka, T., Nishizawa, M., and Ikeuchi, T. (2012). Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid- β at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3 β signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 35222–35233.
- Tong, L., Prieto, G.A., Kramár, E.A., Smith, E.D., Cribbs, D.H., Lynch, G., and Cotman, C.W. (2012). Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 β via p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 32, 17714–17724.

Tossavainen, H., Hellman, M., Piirainen, H., Jaakola, V.-P., and Permi, P. (2015). H(N), N, C(α), C(β) and C' assignments of the intrinsically disordered C-terminus of human adenosine A2A receptor. *Biomol NMR Assign* 9, 403–406.

Townsend-Nicholson, A., and Shine, J. (1992). Molecular cloning and characterisation of a human brain A1 adenosine receptor cDNA. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 16, 365–370.

Townsend-Nicholson, A., Baker, E., Schofield, P.R., and Sutherland, G.R. (1995). Localization of the adenosine A1 receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. *Genomics* 26, 423–425.

Tracy, T.E., Sohn, P.D., Minami, S.S., Wang, C., Min, S.-W., Li, Y., Zhou, Y., Le, D., Lo, I., Ponnusamy, R., et al. (2016). Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss. *Neuron* 90, 245–260.

Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105–1111.

Travassos, M., Santana, I., Baldeiras, I., Tsolaki, M., Gkatzima, O., Sermin, G., Yener, G.G., Simonsen, A., Hasselbalch, S.G., Kapaki, E., et al. (2015). Does Caffeine Consumption Modify Cerebrospinal Fluid Amyloid- β Levels in Patients with Alzheimer's Disease? *J. Alzheimers Dis.* 47, 1069–1078.

Tsao, H.-K., Chiu, P.-H., and Sun, S.H. (2013). PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death Dis* 4, e751.

Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 210–215.

Tsutsui, S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V.W., Winston, B.W., Warren, K., and Power, C. (2004). A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 24, 1521–1529.

V

Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., and Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516–519.

Valério-Gomes, B., Guimarães, D.M., Szczupak, D., and Lent, R. (2018). The Absolute Number of Oligodendrocytes in the Adult Mouse Brain. *Front Neuroanat* 12, 90.

Van der Jeugd, A., Ahmed, T., Burnouf, S., Belarbi, K., Hamdame, M., Grosjean, M.E., Humez, S., Balschun, D., Blum, D., Buee, L., et al. (2011). Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem* 95, 296–304.

- Van der Jeugd, A., Blum, D., Raison, S., Eddarkaoui, S., Buée, L., and D'Hooge, R. (2013). Observations in THY-Tau22 mice that resemble behavioral and psychological signs and symptoms of dementia. *Behav. Brain Res.* *242*, 34–39.
- Van Kolen, K., and Slegers, H. (2006). Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signalling networks. *Purinergic Signal.* *2*, 451–469.
- Vasek, M.J., Garber, C., Dorsey, D., Durrant, D.M., Bollman, B., Soung, A., Yu, J., Perez-Torres, C., Frouin, A., Wilton, D.K., et al. (2016). A complement–microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* *534*, 538–543.
- Vasile, F., Dossi, E., and Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* *222*, 2017–2029.
- Vaz, S.H., Lérias, S.R., Parreira, S., Diógenes, M.J., and Sebastião, A.M. (2015). Adenosine A2A receptor activation is determinant for BDNF actions upon GABA and glutamate release from rat hippocampal synaptosomes. *Purinergic Signalling* *11*, 607–612.
- Vecchio, E.A., White, P.J., and May, L.T. (2019). The adenosine A2B G protein-coupled receptor: Recent advances and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* *198*, 20–33.
- Venegas, C., and Heneka, M.T. (2017). Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.* *101*, 87–98.
- Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* *98*, 239–389.
- Viana da Silva, S., Haberl, M.G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Goncalves, N., Gorlewicz, A., Malezieux, M., Goncalves, F.Q., Grosjean, N., et al. (2016). Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. *Nat Commun* *7*, 11915.
- Vignoli, B., Battistini, G., Melani, R., Blum, R., Santi, S., Berardi, N., and Canossa, M. (2016). Peri-Synaptic Glia Recycles Brain-Derived Neurotrophic Factor for LTP Stabilization and Memory Retention. *Neuron* *92*, 873–887.
- Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D.W., and Marambaud, P. (2011). AMPK is abnormally activated in tangle-and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathologica* *121*, 337–349.
- Vinters, H.V. (2015). Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annu Rev Pathol* *10*, 291–319.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *8*.
- Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Tardivel, M., Chouala, M.S., Sultan, A., Marciniak, E., Humez, S., Binder, L., Kaye, R., et al. (2015). Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic

acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiology of Disease* 82, 540–551.

Vossel, K.A., Zhang, K., Brodbeck, J., Daub, A.C., Sharma, P., Finkbeiner, S., Cui, B., and Mucke, L. (2010). Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science* 330, 198.

W

Walker, D.G., Dalsing-Hernandez, J.E., Campbell, N.A., and Lue, L.-F. (2009). Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp. Neurol.* 215, 5–19.

Wall, M.J., and Dale, N. (2013). Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 591, 3853–3871.

Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept. Lett.* 11, 213–228.

Wang, D., and Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology.*

Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience* 17, 22–35.

Wang, J., Tanila, H., Puoliväli, J., Kadish, I., and van Groen, T. (2003). Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 318–327.

Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal of Neuroscience* 25, 59–68.

Wang, R., Meschia, J.F., Cotter, R.J., and Sisodia, S.S. (1991). Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 266, 16960–16964.

Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., et al. (2017). The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 12, 5.

Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., and Barnard, E.A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 324, 219–225.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 1858–1862.

Weltha, L., Reemmer, J., and Boison, D. (2018). The role of adenosine in epilepsy. *Brain Research Bulletin* S0361923018306336.

Wharton, S.B., O'Callaghan, J.P., Savva, G.M., Nicoll, J. a. R., Matthews, F., Simpson, J.E., Forster, G., Shaw, P.J., Brayne, C., Ince, P.G., et al. (2009). Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27, 465–473.

Wheeler, D.W., White, C.M., Rees, C.L., Komendantov, A.O., Hamilton, D.J., and Ascoli, G.A. (2015). Hippocampome.org: a knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife* 4.

Wilde, S.A., Valley, J.W., Peck, W.H., and Graham, C.M. (2001). Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago. *Nature* 409, 175–178.

Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359–362.

Witman, G.B., Cleveland, D.W., Weingarten, M.D., and Kirschner, M.W. (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 4070–4074.

Wohleb, E.S. (2016). Neuron–Microglia Interactions in Mental Health Disorders: “For Better, and For Worse.” *Frontiers in Immunology* 7.

Wohleb, E.S., Terwilliger, R., Duman, C.H., and Duman, R.S. (2018). Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. *Biol. Psychiatry* 83, 38–49.

Wöhler, F. (1828). Über künstliche Bildung des Harnstoffs. *Ann Phys Chem* 253–256.

Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., and Proud, C.G. (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, 609–615.

Wu, L.G., and Saggau, P. (1994). Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12, 1139–1148.

Wu, J.W., Hussaini, S.A., Bastille, I.M., Rodriguez, G.A., Mrejeru, A., Rilett, K., Sanders, D.W., Cook, C., Fu, H., Boonen, R.A.C.M., et al. (2016). Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nature Neuroscience* 19, 1085–1092.

Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., and Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453–457.

Y

Yagishita, S., Murayama, M., Ebihara, T., Maruyama, K., and Takashima, A. (2015). Glycogen Synthase Kinase 3β-mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of

Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2. *The Journal of Biological Chemistry* 290, 29438–29448.

Yamada, K., Holth, J.K., Liao, F., Stewart, F.R., Mahan, T.E., Jiang, H., Cirrito, J.R., Patel, T.K., Hochgräfe, K., Mandelkow, E.-M., et al. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 211, 387–393.

Yamamoto, M., Guo, D.-H., Hernandez, C.M., and Stranahan, A.M. (2019). Endothelial Adora2a Activation Promotes Blood–Brain Barrier Breakdown and Cognitive Impairment in Mice with Diet-Induced Insulin Resistance. *J. Neurosci.* 39, 4179–4192.

Yang, Q., Guo, M., Wang, X., Zhao, Y., Zhao, Q., Ding, H., Dong, Q., and Cui, M. (2017). Ischemic preconditioning with a ketogenic diet improves brain ischemic tolerance through increased extracellular adenosine levels and hypoxia-inducible factors. *Brain Res.* 1667, 11–18.

Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257–263.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351.

Yu, L., Shen, H.-Y., Coelho, J.E., Araújo, I.M., Huang, Q.-Y., Day, Y.-J., Rebola, N., Canas, P.M., Rapp, E.K., Ferrara, J., et al. (2008). Adenosine A_{2A} receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms. *Annals of Neurology* 63, 338–346.

Z

Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *Journal of Neuroscience* 32, 6391–6410.

Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2010). Aβ oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, 11938–11950.

Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V.D., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., et al. (2015). Neutrophils promote Alzheimer’s disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature Medicine* 21, 880–886.

Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O’Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and

splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* *34*, 11929–11947.

Zhao, W., Ma, L., Cai, C., and Gong, X. (2019). Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- κ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. *Int. J. Biol. Sci.* *15*, 1571–1581.

Zhao, Z.-A., Zhao, Y., Ning, Y.-L., Yang, N., Peng, Y., Li, P., Chen, X.-Y., Liu, D., Wang, H., Chen, X., et al. (2017a). Adenosine A2A receptor inactivation alleviates early-onset cognitive dysfunction after traumatic brain injury involving an inhibition of tau hyperphosphorylation. *Translational Psychiatry* *7*, e1123.

Zhao, Z.-A., Li, P., Ye, S.-Y., Ning, Y.-L., Wang, H., Peng, Y., Yang, N., Zhao, Y., Zhang, Z.-H., Chen, J.-F., et al. (2017b). Perivascular AQP4 dysregulation in the hippocampal CA1 area after traumatic brain injury is alleviated by adenosine A2A receptor inactivation. *Scientific Reports* *7*.

Zheng, H., and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* *1*, 5.

Zhou, X., Oishi, Y., Cherasse, Y., Korkutata, M., Fujii, S., Lee, C.-Y., and Lazarus, M. (2019). Extracellular adenosine and slow-wave sleep are increased after ablation of nucleus accumbens core astrocytes and neurons in mice. *Neurochem. Int.* *124*, 256–263.

Zimmermann, H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* *17*, 420–426.

Zimmermann, H. (2006). Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found. Symp.* *276*, 113–128; discussion 128-130, 233–237, 275–281.

Zimmermann, H., Zebisch, M., and Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* *8*, 437–502.

Zotova, E., Bharambe, V., Cheaveau, M., Morgan, W., Holmes, C., Harris, S., Neal, J.W., Love, S., Nicoll, J.A.R., and Boche, D. (2013). Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. *Brain* *136*, 2677–2696.

Zuchora, B., Turski, W.A., Wielosz, M., and Urbańska, E.M. (2001). Protective effect of adenosine receptor agonists in a new model of epilepsy--seizures evoked by mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid, in mice. *Neurosci. Lett.* *305*, 91–94.

ANNEXES

Publications en premier ou co-premier auteur :

Cellai, L.*, **Carvalho, K.***, Faivre, E., Deleau, A., Vieau, D., Buée, L., Blum, D., Mériaux, C., Gomez-Murcia, V., 2018. The Adenosinergic Signaling: A Complex but Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00520>

Paiva, I.*, **Carvalho, K.***, Santos, P.*, Cellai, L.*, Pavlou, M.A.S., Jain, G., Gnad, T., Pfeifer, A., Vieau, D., Fischer, A., Buée, L., Outeiro, T.F., Blum, D., 2019. A 2A R-induced transcriptional deregulation in astrocytes: An in vitro study. *Glia* glia.23688. <https://doi.org/10.1002/glia.23688>

Carvalho K.*, Faivre E.*, Pietrowski MJ.#, Marques X.#, Gomez-Murcia V., Deleau A., Huin V., Hansen JN., Kozlov S., Danis C., Temido-Ferreira M., Coelho JE., Mériaux C., Eddarkaoui S., Le Gras S., Dumoulin M., Cellai L., NeuroCEB Brain Bank, Landrieu I., Chern Y., Hamdane M., Buée L., Boutillier AL., Levi S., Halle A., Lopes LV. and Blum D.. Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in Tau pathology linked to neuronal adenosine A2A receptors. *Brain*, *in press* (Article en annexe).

* co-premiers auteurs, #co-secondes auteurs

Autres publications :

Laurent, C., Dorothée, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., Dong, Y., Légeron, F.-P., Leboucher, A., Burnouf, S., Faivre, E., **Carvalho, K.**, Caillierez, R., Zommer, N., Demeyer, D., Jouy, N., Sazdovitch, V., Schraen-Maschke, S., Delarasse, C., Buée, L., Blum, D., 2017. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* 140, 184–200. <https://doi.org/10.1093/brain/aww270>

Faivre, E., Coelho, J.E., Zornbach, K., Malik, E., Baqi, Y., Schneider, M., Cellai, L., **Carvalho, K.**, Sebda, S., Figeac, M., Eddarkaoui, S., Caillierez, R., Chern, Y., Heneka, M., Sergeant, N., Müller, C.E., Halle, A., Buée, L., Lopes, L.V., Blum, D., 2018. Beneficial Effect of a Selective Adenosine A2A Receptor Antagonist in the APP^{swe}/PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00235>

Leboucher, A., Ahmed, T., Caron, E., Tailleux, A., Raison, S., Joly-Amado, A., Marciniak, E., **Carvalho, K.**, Hamdane, M., Bantubungi, K., Lancel, S., Eddarkaoui, S., Caillierez, R., Vallez, E., Staels, B., Vieau, D., Balschun, D., Buee, L., Blum, D., 2019. Brain insulin response and peripheral metabolic changes in a Tau transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease* 125, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.01.008>