



HAL
open science

Apport de nouveaux modèles Knock-In humanisés pour la compréhension de la maladie d'Alzheimer

Sarra Kraiem

► **To cite this version:**

Sarra Kraiem. Apport de nouveaux modèles Knock-In humanisés pour la compréhension de la maladie d'Alzheimer. Neurosciences. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS052 . tel-04387097

HAL Id: tel-04387097

<https://theses.hal.science/tel-04387097>

Submitted on 11 Jan 2024

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

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

Université de Lille

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

Sarra Kraïem

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

**Apport de nouveaux modèles *Knock-In* humanisés
pour la compréhension de la maladie d'Alzheimer**

Soutenue publiquement le 14/12/2022 devant le jury composé de :

Pr. Karelle Leroy	Rapporteuse
Dr. Benoît Delatour	Rapporteur
Dr. Isabelle Landrieu	Examinatrice
Dr. Marc Dhenain	Examineur
Dr. Valérie Buée-Scherrer	Directrice de thèse

" يوزن المرء بقوله، ويقوم بفعله "

ابن خلدون

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci au Pr. **Karelle Leroy** et au Dr. **Benoît Delatour** d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail. Merci également au Dr. **Isabelle Landrieu** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice. Merci au Dr. **Marc Dhenain** de m'avoir accompagné lors de ces 3 années de thèse en faisant partie de mon jury de CSI et de mon jury de thèse ainsi que pour tous vos conseils. Je remercie aussi le Dr. **Jean-Charles Lambert** pour vos avis et votre bienveillance durant mes CSI.

Cette thèse a été particulièrement difficile mais je pense que j'ai quand même beaucoup évolué et beaucoup appris et pour cela je remercie tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à ce projet à la fois professionnel et personnel.

Je remercie le Dr. **Luc Buée** d'avoir fait le pari de me confier ce nouveau projet et de m'avoir fait confiance et accueilli au sein de l'équipe "Alzheimer & Tauopathies" alias l'équipe LB. Je ne peux pas dire que c'était un pari gagnant mais j'ai fait de mon mieux. Merci d'avoir toujours laissé la porte de votre bureau ouverte pour discuter de mes idées même quand il était 19h et que vous étiez prêt à partir. Je ne sais même plus combien de fois j'ai pleuré dans ce bureau.

Merci à **Valérie** de m'avoir encadrée d'abord en stage de M2 pour continuer sur la thèse, et de m'avoir offert un grand espace de liberté et d'autonomie. Merci de m'avoir fait confiance sur tous les aspects. Je pense que vous avez cette bonne humeur et des qualités humaines que plusieurs chercheurs n'ont pas. Même pendant les périodes difficiles, on a toujours pu discuter et vous m'avez toujours encouragée. Je suis consciente qu'avec la charge que vous avez à l'université ce n'est pas facile tous les jours.

Je remercie tous les chercheurs de l'équipe pour toutes les discussions enrichissantes et la sympathie à mon égard : **Malika Hamdane, Morvane Colin, Didier Vieau, Bernard Sablonnière, Sophie Halliez, Marie-Christine Galas, Susanna Schraen-Maschke, Vincent Huin, Thibaud Lebouvier** et **Claire-Marie Dhaenens**. Je remercie particulièrement **Nicolas Sergeant** sans qui je n'aurais pas eu la chance de faire partie de cette équipe et **Bruno Lefebvre** sans qui mes graphes auraient été très moches. Un grand merci à **David Blum** pour l'honnêteté, le soutien et les précieux conseils, vous m'avez toujours trouvé du temps malgré que vous soyez toujours sous l'eau. Vous m'avez aidé à évoluer, vous n'étiez pas obligé.

J'en profite aussi pour exprimer toute ma gratitude au Pr. **Emmanuel Moyse** pour le master biologie du vieillissement. Merci pour votre dévouement, vos encouragements, votre gentillesse sans égal et surtout votre modestie. Une personne que je n'oublierai jamais, merci de m'avoir accepté dans ce master et m'avoir ouvert la porte pour ces aventures.

Je ne sais pas comment remercier le joyau de l'équipe qui m'a transmis et permis de passer tout le savoir-faire technique mais pas que... Tout d'abord **Sabiha**, je ne vais pas être longue de peur de te faire pleurer. C'est toute la bienveillance et la gentillesse du monde qui est en toi, je ne sais pas comment tu fais pour te soucier de chacun dans le labo. Heureusement que j'ai été autonome rapidement parce qu'il faut l'avouer nos manip à deux c'est fiasco total ! N'empêche je n'ai jamais arrêté d'avoir besoin de toi, toujours proche et loin en même temps. Tu veilleras à prendre soin

de toi quand je ne serai plus au labo et n'oublie pas que je serai toujours là quand tu en auras besoin.

Merci à **Raph** pour toutes nos discussions dans l'animalerie pendant les injections stéréotaxiques surtout et tes conseils en immuno et dans la vie, il n'y avait pas que les tableaux de magique ! C'est qui le patron ?

Merci à **Emilie**, pour tous les conseils, en comportement, en immuno...toutes les discussions et le support dans le labo, pendant les soirées...tu m'as toujours trouvé du temps et tu m'as toujours dit que j'en valais la peine. Merci **Seb, Séverine, Anna** (sans toi je n'aurais jamais su faire une contention je pense), **Hélène** et **Camille**. Merci à **Thomas Comptdaer** pour toute la culture hygiène et sécurité et les anecdotes et à **Thomas Bouillet** pour m'avoir fourni en énergie, qui va me donner des kitkat et des twix maintenant. Tu vas pouvoir te balader dans le labo sereinement maintenant sans avoir peur d'une grenade qui va t'atterrir dessus. Et sinon where is **Bryan**? Toujours là pour la plus belle Tunisienne ! Merci aussi à **Mathilde** de toujours passer et de m'avoir formé au imagers.

Côté technique, je remercie de tout cœur **Antonino** pour toutes les macros sur mesure, ta disponibilité et ta gentillesse infinie (t'inquiète on va faire ça, solution à tous les problèmes). Merci à **Meryem** pour ta joie de vivre et ton grand sourire. Merci aussi à **Mélanie** parce que sans toi je n'aurais pas eu de souris et sans souris je n'aurais pas eu de projet. Merci aussi pour les longues discussions en stéréotaxie, tu m'as beaucoup appris !

Je n'oublie pas celui qui m'a formé, **Théo**, et qui m'a intégré dans le labo, je n'oublie pas de te remercier pour ton humour. Heureusement que ce n'est pas fini après que tu es parti, j'ai toujours droit à tes one man show. Merci aussi de m'avoir présenté **Kévin**, mon mentor et mon psychologue. Après toi j'ai dû voir un vrai psychologue. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, toujours amissss ! T'es devenu comme un grand frère pour moi. La grande sœur c'est **Vicky** c'est pour ça que vous vous chamaillez tout le temps, mais c'est comme ça la vie est dure ! Vous avez changé ma vie au labo et en dehors ! Merci de m'avoir fait rencontrer **Marilu**, qui a pris un peu la relève et pour qui je suis reconnaissante.

Merci aux autres post-docs : **Jhen** (you're the funniest), **Ouada** (pour ta gentillesse et ta bienveillance) et **Bala** (ton effort au RNAseq).

Merci à tous les gens avec qui j'ai partagé mon bureau, vous avez tous égayé mes journées au labo : **Sarah G** qui détient le record, ça m'a fait bizarre de te voir partir, mais c'était pour un monde meilleur. **Amaury**, pour le stage de master passé ensemble, j'ai encore "la moche" écrit sur mon premier carnet du labo. Merci à **Florian** pour le support et les bons moments même si au final tu as fini par m'abandonner aussi ! T'as quand même laissé place à mon petit rayon de soleil, **Sarah**. C'était très agréable de te former, je n'ai plus rien à t'apprendre mais je suis bien contente du coup de main que tu me files. Merci aussi pour la relecture avec **Antoine**, vous êtes au top ! Pour toute la bonne humeur que vous ramenez au labo, la bouffe et les infusions pour apaiser mon âme ! Merci aussi à tous les stagiaires avec qui on a pas mal rigolé : **Alais, Jeanne, Léa, Kim...** et à **Espérance** pour verdir et donner encore plus de vie à notre bureau.

Un grand merci à l'ancienne génération de guerriers et de docteurs respectés sans qui je n'aurais jamais tenu ces 3 ans de thèse. Alors merci pour les conseils, les longues discussions, les encouragements et j'en passe, mais merci aussi pour toutes nos sorties, nos soirées au Uno's (je

me souviens encore de la première fois où j'y étais, je ne savais pas à ce moment-là que ça allait être la première d'une longue série). Une chose est certaine c'est que ça ne s'arrête pas là et qu'on va continuer à se voir régulièrement parce qu'une chose est sûre je ne peux pas me passer de vous : **Elodie** (je ne regrette pas tous les bobards que tu as pu me faire croire, j'espère que tu t'éclates en Asie et que tu révises la chorée de Jerusalema, t'as été la première qui a essuyé mes larmes de désespoirs dans le labo). **Marine** (ah lala finalement heureusement qu'on a écrit notre thèse en même temps, ça a rendu la tâche un peu moins morose et j'espère que tu ne m'oublieras pas quand tu seras CEO et que je t'enverrai un mail avec mon CV en te vouvoyant). **Marie et Chloé** loin des yeux mais pas loin du cœur (nos activités du jeudi soir me manquent beaucoup mais il y en aura des meilleures), mais encore, **Mégane** (je pense encore à toi quand je monte mes lames avec du Vectashield), **Thomas R** (j'espère que tu te souviens de ce que je t'ai appris, là où t'es tu peux insulter qui tu veux), **Clément, Georgia**, la pépète **Sarah Lieger**... et je n'oublie pas tous les **Max, Renaud et PAC**.

Je remercie aussi **Hamza**, c'était un plaisir de travailler avec toi et ça sera toujours un plaisir de partager ce papier KI avec toi, ta gentillesse et ta bienveillance c'est du jamais vu !

Merci également à la nouvelle génération qui nous a rejoints en cours de route, je vous souhaite de profiter de cette expérience et de devenir les docteurs que vous rêvez d'être : **Agathe** (t'as forcé t'as réussi et pour ça merci ;)), **Marie, Claire, Rislane, Ilda**...

Même si la plupart des congrès que j'ai fait étaient en ligne, la saveur des derniers en valait la peine. J'ai passé de très bons moments avec les alliés des congrès : Merci à **Chirine, Marie-Amandine et Adriana**. Il faut qu'on garde la dynamique !

Un grand merci à mon équipe de cœur de m'avoir évité la dépression à plusieurs reprises, vous êtes vite devenus de bons amis avec qui je partage beaucoup de choses : **Paolo, Adri, Leti, Ludo**, et aux membres extérieurs : le 2ème **Adri et Caro**. Merci aussi à la plus belle **Mariona**, à **Gaspard, Amandine, Ophélie, Nour, Nabil, Fatima, Sree, Liesel**...

Je remercie l'incroyable secrétariat qu'on a, peu importe le problème tant que vous vous en occupiez pour moi c'était déjà réglé ! Vos sourires et la bonne humeur que vous faites régner au labo m'ont permis de garder mon sourire parce que finalement vous êtes les premières personnes que je vois le matin. Vous avez toujours su dire les bon mots, merci pour tout : à **Michèle, Nathalie, Sophie, Marion et Céline** (je ne sais pas comment tu fais mais tu as toujours su me trouver du temps et me rassurer quand j'en ai eu besoin, je te remercie énormément).

Merci à **Karim** pour toutes les blagues sur ma taille, merci à **Laifa** de toujours nous trouver des solutions à tout, et à **Thomas** pour sa bonne humeur le matin et sa sympathie, il faut bien dire que vous nous rendez la vie plus simple et plus agréable, on a bien vu qu'on se noie dans un verre d'eau sans vous.

A tous mes amis aux quatre coins du monde, merci ! Proches ou loin, vous avez toujours été présents pour moi même avec un coup de fil. Les moments passés avec chacun de vous n'ont fait que me ressourcer et surtout pendant la période d'écriture de cette thèse et cet été agréablement dur : **Mayouch, Marina et Youssef** (je t'ai épuisé avec mes crises de panique et mes talents sur word, merci pour ta patience) et puis **Sara, Mahdouch, Yasmina** (le paddle aura été ma seule issue)... **Emira** toi tu sais tout, et puis tous mes potes, je ne vais pas citer tout le monde sinon il me faudra encore 4 pages de plus, je vous aime et merci rien que d'exister !

Finalement, je remercie ma famille qui me soutient aussi malgré la distance, des fois j'ai l'impression d'être avec vous avec les longs appels vidéo. Merci de vous occuper de moi à chaque fois que je rentre et surtout pendant ce dernier séjour pendant lequel je ne pouvais pas quitter la maison avec l'écriture de la thèse. Heureusement que tout venait à ma table ! Merci à tous ceux qui ont fait l'effort de se déplacer pour me voir même quelques minutes, j'ai passé de très bon moment à profiter et rigoler et oublier un peu que je n'étais pas trop en vacances.

Mais encore...Merci à **Thibaut** pour la confiance, la joie et la stabilité que tu m'as apportées mais aussi tous les bons petits plats broyés ou pas qui m'ont permis de ne pas mourir. Je ne sais pas comment ça se serait passé sans toi, tu as été là pour moi quand tout allait mal et tu es resté quand ça allait mieux. Merci aussi à ta petite famille ! J'ai bien de la chance de t'avoir. Cette thèse m'a permis de te rencontrer au final...

Merci à **la région Hauts-de-France et à l'INSERM** pour avoir financé mes trois années de thèse et à **l'école doctorale de Lille** surtout pour la panoplie de formations offertes. Merci au **collège doctoral de Lille** pour la chance que j'ai eu à poursuivre un axe que j'aimais bien avec les parcours de compétences pour l'entreprise. Merci à **Jen** pour l'opportunité de faire mon immersion en entreprise au sein de StarkAge Therapeutics mais aussi pour toutes les fois où tu m'as fait pleurer de rire pendant nos séances de stretching toi et **Marion** ! Vous êtes incroyables !

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer, principale cause de démence chez le sujet âgé, est caractérisée sur le plan neuropathologique par une accumulation extracellulaire de peptide amyloïde qui précède une agrégation intraneuronale de protéines Tau anormalement et hyperphosphorylées. Cette agrégation de Tau provoque la mort neuronale qui conduit aux troubles cognitifs. Dans le but de mimer la pathologie et de comprendre les mécanismes qui conduisent au développement des deux protéinopathies, plusieurs modèles transgéniques ont été générés. Ces modèles demeurent essentiellement des modèles de surexpression des protéines au niveau du système nerveux central.

Afin d'éviter cette surexpression, nous avons généré un nouveau modèle Tau *Knock-In* au sein du laboratoire qui repose sur l'insertion dans le locus murin *Mapt* d'un ADNc codant une isoforme de Tau 1N4R mutée en P301L. Ainsi, l'expression de ce transgène est sous le contrôle du promoteur murin. Nous avons ensuite croisé ce modèle avec un modèle APP *Knock-In* humanisé pour le peptide amyloïde (Saito et al., 2014). Le modèle APPxTau *Knock-In* obtenu a été étudié en comparaison avec les contrôles simples mutants et des contrôles de portée sauvage afin d'étudier le développement potentiel de pathologies concomitantes liées à la co-expression des deux protéines humanisées.

Le nouveau modèle a été caractérisé à 6 et 12 mois au niveau métabolique, comportemental mais aussi moléculaire et biochimique. Les résultats ont révélé l'absence de tout phénotype métabolique dans le modèle APPxTau à 6 mois malgré une altération de l'homéostasie du glucose observée chez le modèle Tau KI. L'étude du modèle double mutant montre une expression de transgènes humains et de protéines correspondantes avec une phosphorylation de Tau accrue dans le cortex ainsi qu'un nombre augmenté de plaques amyloïdes par rapport aux modèles simple mutants. Une neuroinflammation liée à la pathologie amyloïde a également été détectée dans le cortex et l'hippocampe. A ces âges, aucune agrégation visible de Tau ou dégénérescence neuronale n'a pu être observée. Une altération de la mémoire corrélée aux lésions amyloïdes a cependant été détectée. Une analyse transcriptomique suggère que ces altérations seraient accentuées par une hypoexcitabilité neuronale chronique reliée à l'expression de la Tau humaine dans ce modèle ainsi qu'une dominance du phénotype amyloïde aux âges étudiés.

Dans ce modèle, l'absence de l'activité d'épissage et la complexité de la pathologie n'est pas récapitulée avec l'introduction d'une seule isoforme de Tau humaine même si son expression est régie par le promoteur endogène murin. Des expériences d'inoculation intrahippocampique de lysats de cerveaux issus de patients Alzheimer chez le modèle Tau *Knock-In* ne montre pas d'interaction entre cette isoforme de Tau et la Tau pathologique en absence d'amyloïdose. Cependant, il faut plus de deux décennies à l'amyloïdose pour induire une pathologie Tau chez l'homme. Ainsi, l'absence de la pathologie Tau dans le modèle APPxTau peut être reliée à une question de temps. Ce modèle représenterait donc des troubles précoces de la maladie d'Alzheimer et pourrait servir à étudier les facteurs aggravants ou protecteurs de la pathologie Tau et donc de la dégénérescence neuronale.

Mots-clés : maladie d'Alzheimer, protéine précurseur de l'amyloïde (APP), peptide bêta-amyloïde (A β), protéine Tau, Tauopathie, modèles humanisés, *Knock-In*, propagation.

ABSTRACT

Alzheimer's disease, primary cause of dementia in the elderly, is characterized at the neuropathological level by extracellular accumulation of amyloid peptide that precedes an intraneuronal aggregation of Tau proteins found abnormally and hyperphosphorylated. This Tau aggregation causes neuronal death that leads to cognitive impairment. Most of the existing animal models mimic Alzheimer's disease pathology by overexpressing both proteins in the central nervous system.

In order to obtain a physiological model, our laboratory has developed a *Knock-In* mouse model by the insertion of a cDNA encoding 1N4R human Tau isoform (mutated at P301L) directly into the mouse *Mapt* locus. We then generated a new mouse model by crossing it with an APP *Knock-In* humanized for the amyloid peptide sequence (Saito et al., 2014). The resulting APPxTau *Knock-In* model was studied in comparison with single mutants and wild-type littermates in order to investigate the development of concomitant pathologies linked to the co-expression of the two humanized proteins.

The new model was characterized at 6 and 12 months at metabolic, behavioral levels but also molecular and biochemical ones. Results reveal the absence of any metabolic phenotype within the APPxTau model despite an impaired glucose homeostasis observed in the Tau model. Analyses conducted on the APPxTau model show an expression of human transgenes and corresponding proteins with increased Tau phosphorylation in the cortex as well as an increasing number of amyloid plaques compared to the single mutants. Increased neuroinflammation related to amyloid pathology is also detected in the cortex and hippocampus. At these ages, no neuronal degeneration related to Tau aggregation is observed. However, memory impairment correlates with amyloid lesions. A transcriptomic analysis suggests that these alterations would be accentuated by a chronic neuronal hypoexcitability related to the expression of human Tau in this model as well as a dominant amyloid phenotype at the ages studied.

Lacking Tau splicing in this model by expressing only one isoform of Tau along with the complexity of Alzheimer's disease may interfere with recapitulating the pathology's features. Intrahippocampal inoculation experiments of brain lysates from Alzheimer's patients failed to show an interaction between this Tau isoform and pathological Tau in the absence of amyloidosis. However, it takes more than two decades for amyloidosis to induce tau pathology in humans. Thus, the absence of tau pathology in the APPxTau model may be a question of time. This model displays with early stages of Alzheimer's disease and could serve to investigate aggravating or protective factors of Tau pathology and therefore neurodegeneration.

Keyword: Alzheimer's disease, amyloid precursor protein (APP), beta-amyloid peptide (A β), Tau protein, Tauopathy, humanized mouse models, *Knock-In*, propagation.

COMMUNICATIONS ET FORMATIONS

Posters :

ADPD 2022: A new *Knock-In* mouse model of AD displays Tau and amyloid interaction

S. Kraiem, H. Benderradji, S. Eddarkaoui, K. Carvalho, E. Faivre, N. Sergeant, D. Blum, L. Buee, V. Buée-Scherrer

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1172, Lille Neurosciences & Cognition, Lille, France

FENS 2022: A novel *Knock-In* model recapitulates early events of Alzheimer's disease.

S. Kraiem, H. Benderradji, S. Eddarkaoui, S. Leclercq, K. Carvalho, E. Faivre, N. Sergeant, L. Buee, D. Blum, V. Buée-Scherrer

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1172 - Lille Neurosciences & Cognition, 59000 Lille, France

ADPD 2021: *Knock-In* human tau mouse model recapitulates early events of tau pathology

S. Kraiem, S. Eddarkaoui, T. Boschetti, H. Benderradji, K. Carvalho, E. Faivre, N. Sergeant, D. Blum, L. Buee, V. Buée-Scherrer

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1172, Lille Neurosciences & Cognition, Lille, France

EuroTau 2021: A new *Knock-In* mouse model of AD displays Tau and amyloid interaction

S. Kraiem, H. Benderradji, S. Eddarkaoui, K. Carvalho, E. Faivre, N. Sergeant, L. Buee, D. Blum, V. Buée-Scherrer

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1172, Lille Neurosciences & Cognition, Lille, France

AAIC 2020: A novel *Knock-In* Human Tau mouse model of tauopathy

S. Kraiem, S. Eddarkaoui, T. Boschetti, H. Benderradji, K. Carvalho, E. Faivre, N. Sergeant, D. Blum, L. Buee, V. Buée-Scherrer

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S1172 - Lille Neurosciences & Cognition, Lille, France

Formations :

- Formation à l'expérimentation animale de niveau 2 (décembre 2019)
- Formation à la chirurgie animale (7 juin – 11 juin 2021)
- Research integrity in scientific professions (avril 2020)
- Formation continue au Parcours de compétences à l'entreprise 2020-2022
- Challenge doc (30 juin 2021 - 2 juillet 2021)
- Créer son activité (10 décembre 2020 - 18 février 2021)
- The fundamentals of team management (08 février 2021 - 9 février 2021)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	I
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
COMMUNICATIONS ET FORMATIONS.....	VII
SOMMAIRE.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
INTRODUCTION.....	1
Partie 1 : La maladie d'Alzheimer.....	2
1 La démence.....	2
2 Historique de la maladie d'Alzheimer	2
3 Chiffres clés et impact socio-économique	4
4 Les différentes phases de la MA	4
4.1 Trouble cognitif léger ou Mild Cognitive impairment (MCI)	5
5 Diagnostic.....	6
5.1 Diagnostic de certitude	6
5.2 Diagnostic clinique.....	7
Partie 2 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	9
1 Neuropathologie.....	9
2 Les dépôts amyloïdes.....	10
2.1 Le précurseur de peptide amyloïde (APP)	10
2.2 Dérégulation de la clairance et de la balance entre la voie amyloïdogénique et la voie non-amyloïdogénique	14
2.3 Le peptide amyloïde	14
2.4 Les différents types de dépôts amyloïdes	16
2.5 Neurotoxicité des dépôts amyloïdes	17
2.6 Propagation d'A β	18
3 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	20
3.1 Génétique de la protéine Tau	20
3.2 Structure de la protéine Tau	21
3.3 Fonctions physiologiques de la protéine Tau.....	22
3.4 Modifications post-traductionnelles de Tau	25

3.5	Processus d'agrégation de Tau	27
3.6	Sécrétion de Tau	28
3.7	Dépôts de Tau	29
3.8	L'hypothèse de la propagation type prion.....	30
3.9	Effets de la réduction de Tau	31
4	Perte synaptique et neuronale.....	32
5	Réactivité gliale.....	33
5.1	Astrocytes	35
5.2	Microglies	36
5.3	Les oligodendrocytes.....	36
5.4	Contribution des médiateurs de l'inflammation	37
5.5	Intérêt thérapeutique.....	37
Partie 3 : Modélisation de la maladie d'Alzheimer		38
1	Etyologie.....	38
1.1	Facteurs génétiques et formes familiales.....	38
1.2	Formes sporadiques	39
1.3	La maladie d'Alzheimer et les troubles métaboliques	40
1.4	Tauopathies.....	42
2	Traitements	43
3	Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer	44
3.1	Modèles murins de première génération : souris ayant intégré un ou plusieurs transgènes dans son génome	45
3.2	Modèles animaux de deuxième génération ou modèles d'insertion ciblée / recombinaison homologue	50
3.3	Modèles non transgéniques.....	52
3.4	Conclusion modèles	52
Partie 4 : Interaction Tau/Aβ.....		54
1	Hypothèse de la cascade amyloïde.....	54
1.1	Arguments en faveur de la cascade amyloïde	55
1.2	Modèles appuyant la cascade amyloïde.....	56
1.3	Limites de la cascade amyloïde	57
2	Hypothèse à double voies.....	58
2.1	Mécanismes d'interaction directe A β -Tau	59
2.2	Implication de la protéine kinase Fyn dans l'interaction A β -Tau	60
3	Effet antagoniste de Tau et A β	61
4	Implication des médiateurs de l'inflammation dans l'interaction A β -Tau.....	62
5	Autres hypothèses	63
OBJECTIFS DE LA THÈSE.....		65
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		67
1	Animaux utilisés pour l'étude	68
1.1	Modèles transgéniques.....	68
1.2	Fond génétique et hébergement	70
1.3	Injections stéréotaxiques.....	70
2	Génotypage.....	72
3	Analyses métaboliques	72

3.1	Analyses en cages métaboliques	72
3.2	Mesure de glycémie.....	72
4	Tests de comportement	72
4.1	Motricité, test du champ ouvert	73
4.2	Tests d'anxiété.....	73
4.3	Tests de mémoire.....	74
5	Mise à mort et dissection des souris	75
5.1	Prélèvement des tissus.....	75
5.2	Perfusion.....	75
6	Analyses transcriptionnelles.....	76
6.1	Extraction des ARN.....	76
6.2	Rétrotranscription.....	76
6.3	PCR quantitative.....	77
6.4	Séquençage de l'ARNm	78
7	Analyses biochimiques.....	79
7.1	Tissu cérébral humain	79
7.2	Préparation des échantillons	79
7.3	Dosage et préparation des protéines	79
7.4	Western Blot	80
7.5	Électrophorèse bidimensionnelle.....	81
7.6	Préparation des fractions contenant les protéines Tau solubles et insolubles	81
8	Dosages ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	82
8.1	Dosage du peptide amyloïde dans le cortex et l'hippocampe en ELISA	82
8.2	Dosage de Tau dans le cortex et l'hippocampe en ELISA.....	82
9	Immunohistochimie	83
9.1	Préparation des coupes	83
9.2	Immunohistochimie.....	83
9.3	Immunofluorescence.....	84

RÉSULTATS87

Etude 1 : Caractérisation phénotypique du modèle Tau KI88

1	Etude métabolique.....	88
2	Troubles d'homéostasie du glucose dans le modèle Tau KI.....	90
3	Troubles liés à l'expression de la Tau humaine mutée dans le modèle Tau KI à l'âge de 16 mois	91
3.1	Anxiété et troubles de la mémoire spatiale à court terme	91
3.2	Expression du transgène en transcriptomique	92
3.3	Expression et phosphorylation de Tau	92
3.4	Exploration synaptique et neuroinflammation.....	93

Etude 2 : Induction d'une amyloïdose dans le modèle Tau KI96

1	Analyse de la pathologie amyloïde en post-mortem	97
2	Effet de la β -amyloïdose sur le phénotype pathologique du modèle Tau KI	100
2.1	Au niveau métabolique.....	100
2.2	Au niveau comportemental.....	103
2.3	Au niveau de l'expression de Tau.....	106
2.4	Au niveau de la phosphorylation de Tau	109
2.5	Au niveau synaptique.....	111
2.6	Au niveau de la neuroinflammation	113

2.7	Au niveau de l'agrégation de Tau.....	116
2.8	Evaluation transcriptionnelle des souris Tau KI et APPxTau	118
Etude 3 : Potentiel agrégatif de la protéine Tau humaine mutée exprimée dans le modèle Tau KI		122
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		126
1	Un nouveau modèle <i>Knock-In</i> de perte de fonction de Tau exprimant P301LTau sous le contrôle du promoteur <i>Mapt</i> murin	127
1.1	Implication du dysfonctionnement de Tau dans la dyshoméostasie du glucose	128
1.2	Troubles précoces de Tauopathies dans le modèle Tau KI.....	129
2	Un nouveau modèle APPxTau <i>Knock-In</i>	131
2.1	Potentiel effet antagoniste de Tau et A β au niveau métabolique.....	131
2.2	Effet potentialisateur de Tau et A β en absence d'agrégation de Tau	132
2.3	Trouble précoces de la MA dans le modèle APPxTau	132
3	Potentiel de propagation de la protéine Tau humaine du modèle Tau KI	136
4	Limites de l'étude	137
5	Avantages des modèles KI.....	138
6	Perspectives générales	138
CONCLUSION		140
BIBLIOGRAPHIE.....		141
ANNEXES.....		179

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Images historiques	3
Figure 2 : Prédiction du nombre de personnes atteintes de la MA âgées de 65 ans et plus et entre 2010 et 2050 aux Etats-Unis.	4
Figure 3 : Marquage hippocampique provenant d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.	6
Figure 4 : IRM pondérée en T1 utilisant une séquence MPRAGE	7
Figure 5 : Schématisation d'un modèle de corrélation entre l'évolution des biomarqueurs de MA au cours du temps et le risque d'occurrence de la maladie.	8
Figure 6 : Progression stéréotypée des lésions Tau et A β	9
Figure 7 : Structure conservée de la famille des protéines APPs.	10
Figure 8 : Clivage de APP par les secrétases selon la voie amyloïdogénique et non-amyloïdogénique.	12
Figure 9 : Représentation schématique des rôles physiologiques du peptide amyloïde.	13
Figure 10 : Processus de formation des plaques amyloïdes.	15
Figure 11 : Marquage des différents dépôts amyloïdes en immunohistochimie.	17
Figure 12 : Mode de transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) entre espèces.	18
Figure 13 : Représentation schématique des isoformes de Tau issues du gène MAPT dans le SNC humain.	21
Figure 14 : Principales fonctions physiologiques de la protéine Tau.	24
Figure 15 : Schématisation des sites de modifications post-traductionnelles de la protéine Tau.	25
Figure 16 : Représentation des sites de phosphorylation potentielle de Tau et de leurs épitopes reconnus par des anticorps spécifiques.	26
Figure 17 : Processus de formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF).	27
Figure 18 : Les dépôts intraneuronaux de la protéine Tau.	30
Figure 19 : Réactivité gliale dans le contexte pathologique.	34
Figure 20 : Mutations identifiées sur le gène APP.	38
Figure 21 : Variants rares et fréquents contribuant à la MA.	40
Figure 22 : Caractéristiques neuropathologiques des différentes Tauopathies.	42
Figure 23 : Mutations identifiées sur le gène MAPT.	43
Figure 24 : Différences de niveau d'expression protéique selon le modèle transgénique.	51
Figure 25 : Séquence des événements pathologiques conduisant à la MA proposée par l'hypothèse de la cascade amyloïde.	55
Figure 26 : Modèle de corrélation potentielle entre le dépôt d'amyloïde β et la protéine Tau en rapport avec les altérations du réseau dans la maladie d'Alzheimer.	57
Figure 27 : Modèles hypothétiques d'interaction entre les 2 lésions Tau et amyloïde dans la MA.	59
Figure 28 : Excitotoxicité des oligomères A β à travers la protéine kinase Fyn.	61
Figure 29 : Accélération et propagation des lésions responsables de la MA.	63
Figure 30 : Stratégie de génération des souris Tau KI.	68
Figure 31 : Représentation de la construction génétique du modèle APP KI (NL-G-F).	69
Figure 32 : Croisement et production des souris APPxTau KI.	69
Figure 33 : Anatomie du crâne de souris.	70

Figure 34 : Principaux anticorps anti-Tau utilisés.....	85
Figure 35 : Schéma illustrant les différents tests effectués sur les souris Tau âgées de 16 mois. .	88
Figure 36 : Troubles du métabolisme chez les souris Tau à 16 mois.	89
Figure 37 : L'expression de la protéine Tau 1N4R mutée P301L induit une altération de la mémoire à court terme et une neuroinflammation dans les souris Tau KI à l'âge de 16 mois.....	95
Figure 38 : Schéma illustrant les analyses effectuées sur le premier lot de souris double transgéniques à l'âge de 6mois.	96
Figure 39 : Schéma illustrant les tests de comportement réalisés sur le deuxième lot de souris double transgéniques à l'âge de 12mois.	97
Figure 40 : Augmentation de l'agrégation des peptides amyloïdes et de la production d'Aβ42 dans le modèle APPxTau à 6mois.....	98
Figure 41 : Analyse de la production et de l'agrégation des peptides amyloïdes dans le modèle APPxTau à 12mois.	99
Figure 42 : Analyses métaboliques du modèle APPxTau et des groupes contrôles.....	103
Figure 43 : Niveaux d'anxiété évalués du modèle APPxTau à 6 et 12mois.	103
Figure 44 : Altération de la mémoire à court terme dans le modèle APPxTau à 12mois.	104
Figure 45 : Altération de la mémoire à long terme chez les femelles au niveau du test du labyrinthe de Barnes à 12mois.	105
Figure 46 : Effet de l'amyloïdose sur l'expression de Tau et sa phosphorylation dans le modèle APPxTau.....	108
Figure 47 : Hyperphosphorylation de Tau dans les APPxTau femelles à 6mois.	110
Figure 48 : Variation des marqueurs synaptiques dans le modèle Tau APPxTau à 12 mois.	112
Figure 49 : Evaluation des marqueurs de neuroinflammation en qPCR dans le modèle APPxTau à 6 et 12 mois.....	113
Figure 50 : Evaluation de la neuroinflammation liée à la pathologie amyloïde dans le modèle APPxTau à 12mois.	115
Figure 51 : Effet de l'injection hippocampique de lysats APP et WT dans les souris Tau KI sur la neuroinflammation et l'agrégation de Tau à un mois post-injection.	117
Figure 52 : Séquençage de l'ARNm chez les souris WT, APP, Tau et APPxTau à l'âge de 12 mois.	118
Figure 53 : L'expression de la protéine Tau 1N4R humaine mutée dérégule l'expression des IEGs.	121
Figure 54 : Cicatrisation gliale et absence d'agrégats de Tau avec l'injection hippocampique de lysats de patients atteints de MA et de sujets témoins dans le modèle Tau KI à un mois post-injection.....	123
Figure 55 : Effet de l'injection hippocampique de lysat Tau chez des souris APP l'agrégation des peptides amyloïdes et la phosphorylation de Tau dans les neurite dystrophiques.	125

Certaines figures ont été réalisées sur www.biorender.com

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des sondes Taqman utilisés.	77
Tableau 2 : Liste des sondes SYBRGREEN utilisées	78
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés.	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN:** acide désoxyribonucléique
- AICD:** APP intracellular domain
- Akt:** protéine kinase B
- AMPAR:** récepteur ionotropique activé par le glutamate
- APLPs:** APP-like proteins
- ApoE:** apolipoprotéine E
- APP:** protéine précurseur de l'amyloïde
- ARN:** acide ribonucléique
- A β :** peptide amyloïde bêta
- BACE:** beta-site APP cleaving enzyme
- BDNF:** brain derived neurotrophic factor
- BHE:** barrière hémato-encéphalique
- BSA:** albumine sérique bovine
- C1qa:** sous-unité A du sous-composant C1q du complément
- CA:** corne d'Ammon
- CAA:** angiopathie amyloïde cérébrale
- CaMKII:** calcium/calmoduline-activated protein
- CBD:** dégénérescence corticobasale
- CCL4:** chemokine ligand 4
- CD33:** cluster of differentiation 33
- CD68:** cluster of differentiation 68
- CDK5:** cyclin-dependent like kinase-5
- Clec7a:** membre A de la famille 7 du domaine des lectines de type C ou Dectin-1
- CLU:** clusterine
- Cter:** carboxy-terminal
- CTF:** carboxy-terminal fragment
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-phénylindole

DAVID: database for annotation, visualization and integrated discovery

DNF: dégénérescences neurofibrillaires

DT2: diabète de type 2

Dusp1: dual specificity phosphatase 1

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ESB: encéphalopathie spongiforme bovine

FTDL: dégénérescences lobaires fronto-temporales

GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GH: hormone de croissance

GO: gene oncology

GSK3 β : glycogen synthase kinase-3 β

GWAS: genome-wide association study

hAPP: protéine précurseur de l'amyloïde humaine

HFD: high fat diet

HO: homozygote

HRP: horseradish peroxidase

htau: protéine Tau humaine

Iba1: ionized calcium binding adaptater molecule

IEG: immediate early genes

IgG: immunoglobuline G

IL-1 β : interleukine- 1bêta

IMU: identificateurs moléculaires uniques

IPGTT: test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale

IRM: imagerie par résonance magnétique

Itgax: integrin subunit alpha X

KI: Knock-In

KPI: domaine inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz

LCS: liquide cérébro-spinal

LDS: lithium dodécyl sulfate

LRP1: protéine 1 liée aux récepteurs des lipoprotéines

LTP: potentialisation à long terme

MA: maladie d'Alzheimer

MAPs: microtubule associated proteins

MAPT: microtubule associated protein tau

MCI: mild cognitive impairment

MMSE: mini-mental state examination

MoCA: Montreal cognitive assessment

MTBR: domaine de liaison aux microtubules

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NMDA: N-methyl-D-aspartate

Nr4a: nuclear receptor subfamily 4 group A member 1

Nter: amino-terminal

PAF: paraformaldéhyde

PBS: solution saline tamponnée au phosphate

PCR: polymerase chain reaction

PHF: paired helical filaments

PKA: protein kinase A

PPIA: cyclophiline

PrPC: protéine prion cellulaire

PRR: domaine central riche en proline

PSD95: protéine de densité synaptique 95

PSEN: préséniline

PSP: paralysie supranucléaire progressive

RCI: résistance centrale à l'insuline

RER: respiratory exchange ratio

rTg: repressible transgenic

SDS: sodium dodecyl sulfate

SNAP25: protéine associée au synaptosome 25

SNARE: soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

SNC: système nerveux central

SNP: système nerveux périphérique

Src: nonreceptor tyrosine kinases

TEP: tomographie à émission de positons

TFEB: facteur de transcription EB

TNF: facteur de nécrose tumorale

TREM2: triggering receptor expressed on myeloid cells 2

UTR: untranslated transcribed region

VAMP: vesicle associated membrane proteins

WT: wild-type

INTRODUCTION

Partie 1 : La maladie d'Alzheimer

1 La démence

On appelle démence une atteinte du cerveau qui empêche la réalisation des simples tâches de la vie quotidienne, associée à la perte de certaines fonctions cognitives telles que la mémoire et la capacité de raisonnement (National Health Institute). Ce mot est issu du latin « *demens* » qui signifie sans esprit. La connotation médicale de la démence a été acquise au début du 18^{ème} siècle. La classe de démence sénile a été définie comme une atteinte mentale différentielle caractérisée par une manifestation clinique par Philippe Pinel (1745-1826), un médecin français, professeur d'hygiène et pathologie à l'école de santé de Paris et médecin personnel de Napoléon ainsi que par son étudiant Jean Etienne Esquirol (1772-1840). Ainsi la démence a été admise comme une difficulté mentale due à une maladie inévitablement dépendante de l'âge (Cipriani et al., 2011).

2 Historique de la maladie d'Alzheimer

Une démence rare qui affectait des personnes de moins de 60 ans a été ensuite décrite le 4 novembre 1906 à la 37^{ème} conférence des psychiatres à Tübingen en Allemagne par le neuropathologiste et psychiatre Alois Alzheimer (**figure 1A**) (worldhistoryproject.org). Durant sa conférence, il a discuté le cas d'une patiente qui a été gardée en observation pendant son institutionnalisation à l'hôpital de Francfort.

Alois Alzheimer (1864-1915) a intégré son premier poste en 1888 à l'asile municipal des malades mentaux et épileptiques (*Städtische Heilanstalt für Irre und Epileptische*) à Francfort où Emil Sioli était directeur et où il a passé 14 ans. Il y a rencontré Franz Nissl (1860-1919) qui a développé en 1884 une méthode de fixation et de coloration de préparations microscopiques du système nerveux. Ensemble, ils ont étudié l'anatomie du cortex cérébral ainsi que les pathologies qui peuvent l'affecter. Sa patiente Auguste Deter (**figure 1B**) a été admise à l'asile le 25 novembre 1901. C'est à l'âge de 51 ans que son mari a remarqué son déclin graduel notamment des troubles de la personnalité, des pertes de mémoire et un état de paranoïa (**figure 1C**). L'état de Mme Deter a continué à se détériorer jusqu'à sa mort quatre ans et demi après l'apparition des premiers troubles. Afin de procéder à une autopsie, son cerveau a été transféré à Munich au laboratoire d'Emil Kraepelin (1856-1910), psychiatre le plus influent à l'époque et avec qui travaillait Alois Alzheimer. L'autopsie a révélé une atrophie du cerveau et la coloration du tissu cérébral (appelée maintenant Coloration de Nissl ou Crésyl violet) a révélé deux types d'agrégats dans le cerveau : i) des dépôts protéiques à l'extérieur des neurones, (actuellement connus sous le nom de plaques séniles), plus tard liées à l'accumulation du peptide amyloïde A β ii) une accumulation de protéine

à l'intérieur du neurone (appelée maintenant dégénérescence neurofibrillaire et reliée en 1975 à la protéine appelée Tau) (**figure 1D**) (Weingarten et al., 1975). Ces deux accumulations sont à ce jour considérées comme les lésions principales responsables de la maladie. Durant la même période, d'autres psychiatres comme Gaetano Perusini et Frank Bonfiglio ont décrit des patients présentant des troubles cognitifs et modifications neuroanatomiques similaires. Néanmoins, le nom de la maladie revient à Alois Alzheimer, premier à l'avoir décrite et qui porte son nom (la maladie d'Alzheimer, MA), selon le choix d'appellation d'Emil Kraiepelin dans une publication en 1910 décrivant la maladie dans un livre de psychiatrie (Maurer et al., 1997).

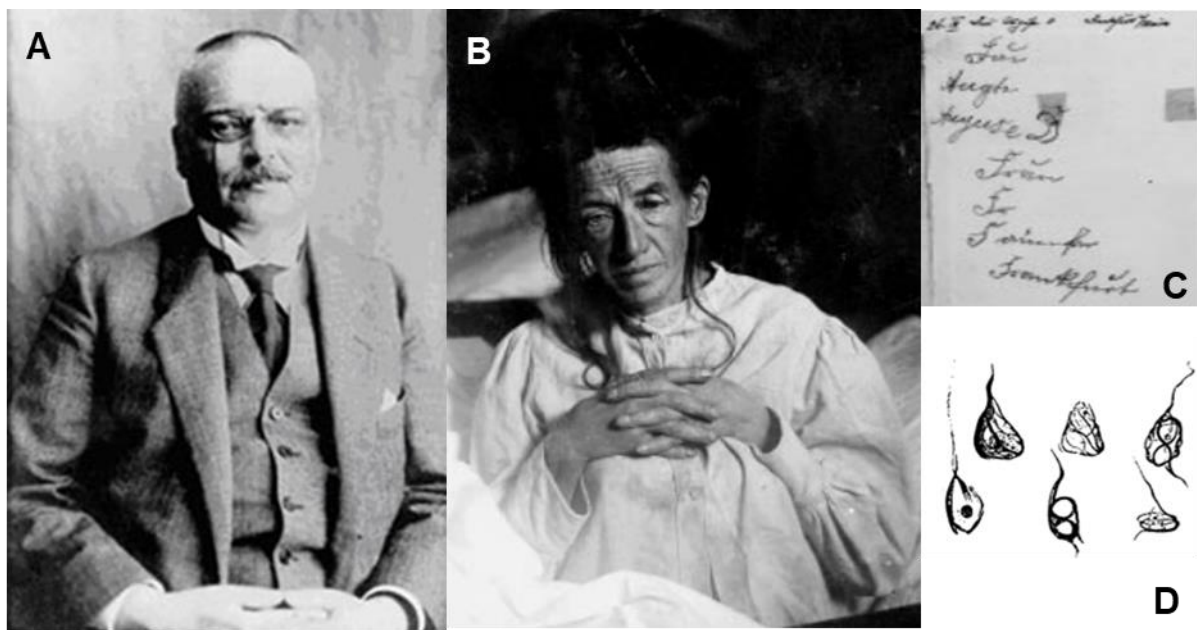


Figure 1 : Images historiques.

(A) Portrait du Dr. Aloïs Alzheimer et (B) de sa patiente Auguste Deter (daté de novembre 1902). (C) Tentatives d'écriture d'Auguste D qualifiées de « trouble amnésique de l'écriture » et datées par Aloïs Alzheimer, retrouvées parmi ces notes manuscrites en Sütterlin documentant en détail les symptômes de sa patiente pendant les quatre premiers jours de son séjour à l'hôpital. (D) Les enchevêtrements neurofibrillaires dessinés par Aloïs Alzheimer (Maurer et al., 1997).

3 Chiffres clés et impact socio-économique

L'organisation Alzheimer's Disease International estime que plus de 55 millions de personnes vivent avec une démence à travers le monde et que ce chiffre augmenterait pour atteindre 78 millions d'ici 2030 (Evolution du nombre de personnes atteintes aux Etats-Unis en **figure 2**). Environ 70% de ces cas de démence sont associés à la MA (World Alzheimer report 2021). C'est donc une maladie liée à l'âge très fréquente qui a de plus en plus d'impact socioéconomique du fait qu'elle contribue considérablement à la perte de l'indépendance ainsi qu'au besoin d'assistance dans les activités de la vie quotidienne. Les personnes malades présentent un besoin d'être assistées et suivies ce qui constitue aussi par conséquent une charge mentale et physique pour les personnes accompagnantes. Le recours à une aide extérieure pour s'occuper d'un proche atteint de démence ou de MA peut s'avérer très coûteux. Ainsi, le coût annuel estimé par personne atteinte de démence en Europe est en moyenne de 32 506,73 euros et de 42 898,65 euros aux États-Unis (Cantarero-Prieto et al., 2020). Ces coûts varient en fonction des types de soins et de la sévérité de la maladie. Ces différents soins varient entre les soins à domicile, l'aide à la vie quotidienne et les soins en maison de retraite. De ce fait, la démence impose indéniablement une charge économique énorme.

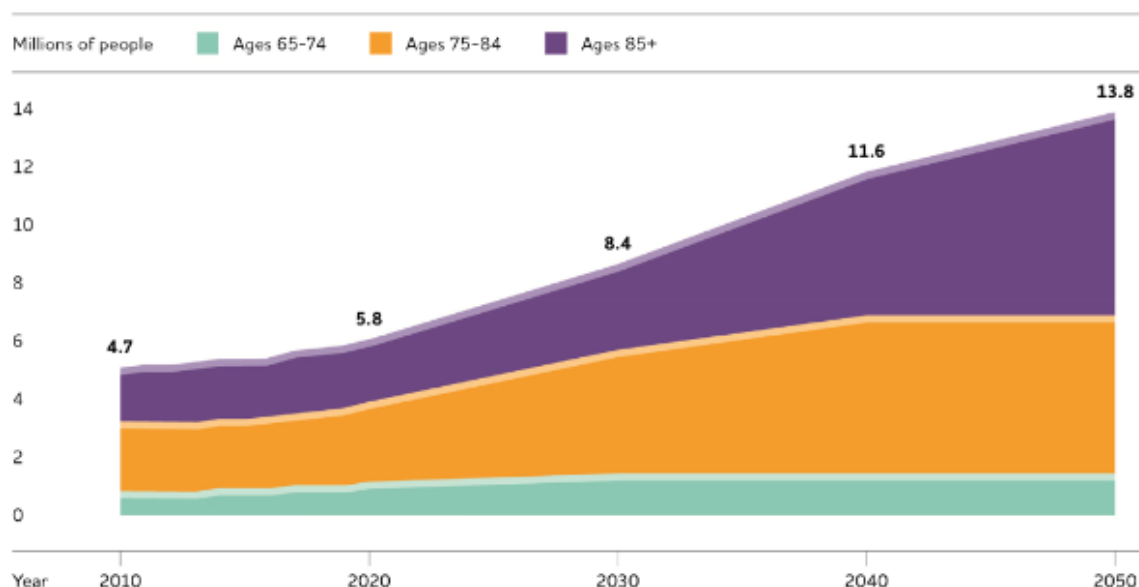


Figure 2 : Prédiction du nombre de personnes atteintes de la MA âgées de 65 ans et plus et entre 2010 et 2050 aux Etats-Unis (2020 Alzheimer's disease facts and figures, 2020).

4 Les différentes phases de la MA

Cette maladie concerne généralement les personnes âgées de plus de 65 ans et se manifeste typiquement par des pertes de mémoire et des perturbations des fonctions exécutives et du langage. Les personnes atteintes présentent une désorientation spatio-temporelle, des troubles

de la personnalité et de sociabilité ainsi qu'une difficulté croissante à réaliser des tâches quotidiennes.

Trois phases caractérisent la maladie :

Une phase préclinique prolongée qui est une phase plutôt asymptomatique suivie d'une phase symptomatique légère à modérée durant laquelle débutent les premiers signes cliniques comme la perte de mémoire. Les patients finissent par atteindre un stade sévère qui rend le malade complètement dépendant de son entourage et s'accompagne d'amnésie (perte partielle ou totale de la mémoire), aphasie (trouble du langage), apraxie (trouble de coordination du mouvement) et agnosie (trouble de reconnaissance de l'information) (Sloane et al., 2002).

4.1 Trouble cognitif léger ou Mild Cognitive impairment (MCI)

Ce syndrome se définit par un déclin cognitif plus élevé que la normale mais pas assez sévère pour être considéré comme de la démence, ce dernier n'impacte pas l'autonomie de l'individu ou ses activités de la vie quotidienne. Sa prévalence varie entre 9 et 13 % chez les adultes de plus de 65 ans avec un risque de développer une démence dans les 2 prochaines années entre 11 et 33% (Gauthier et al., 2006). Des études épidémiologiques soulignent le fait que plusieurs facteurs affectant la population vieillissante peuvent agir sur la réversibilité du syndrome cognitif léger tels que le niveau d'éducation, les facteurs de risque vasculaires, le statut psychiatrique, le fond génétique ainsi que les changements hormonaux et la consommation de médicaments anticholinergiques (Ritchie, 2004).

Ce trouble peut être détecté par une perturbation de la mémoire épisodique ou dans une moindre mesure des fonctions exécutives mais peut aussi être non amnésique. Dans ce cas, les symptômes cliniques peuvent se résumer en un déclin subtil dans le langage ou les capacités visuo-spatiales. Le diagnostic peut être établi par le MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) qui est un test d'évaluation cognitive très sensible adopté dans des contextes cliniques à travers le monde (Nasreddine et al., 2005). Une étude a estimé un taux de conversion pour une cohorte de cas de troubles cognitifs légers en une maladie d'Alzheimer à 41% durant la première année puis à 64% durant la deuxième année (Geslani et al., 2005) montrant que le MCI est un prédicteur précis de la MA sur 1 et 2 ans chez les patients référés à des spécialistes par leurs médecins généralistes. Ainsi, les patients MCI présentent un risque accru de développer la MA et cet état pourrait être considéré comme une phase précoce de la MA. Il est important de garder à l'esprit que ce syndrome constitue un ensemble de symptômes et non pas une pathologie à part entière. L'application des mêmes critères amnésiques peut conduire ou non à une progression en MA selon le statut socio-économique de la personne ce qui souligne un besoin d'élargissement des critères

cliniques pour les individus atteints de troubles cognitifs légers et essayer d'inclure l'historique et la durée des symptômes pour mieux anticiper l'évolution.

Les raisons de l'apparition de troubles cognitifs légers ne sont pas encore totalement expliquées. Néanmoins, une combinaison de facteurs de causalité est observée chez les patients atteints de troubles cognitifs légers. Parmi ces facteurs, un dysfonctionnement cholinergique due à une perte de neurones dans le noyau basal de Meynert riche en acétylcholine et en choline o-acétyltransférase (Mufson et al., 2000), des lésions de la substance blanche et infarctus cérébraux (O'Brien et al., 2003), les dépôts amyloïdes (Mufson et al., 1999), et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires retrouvés dans les structures temporales médiales sont en corrélation avec la déficience cognitive légère (Bennett et al., 2005). Les deux lésions Tau et A β sont retrouvées à des quantités moins importantes que pour un cas de MA.

5 Diagnostic

5.1 Diagnostic de certitude

La maladie d'Alzheimer est une maladie très complexe dont la confirmation au niveau post-mortem repose sur l'observation des dégénérescences neurofibrillaires (**figure 3A-B**) et des plaques amyloïdes (**figure 3C-D**).

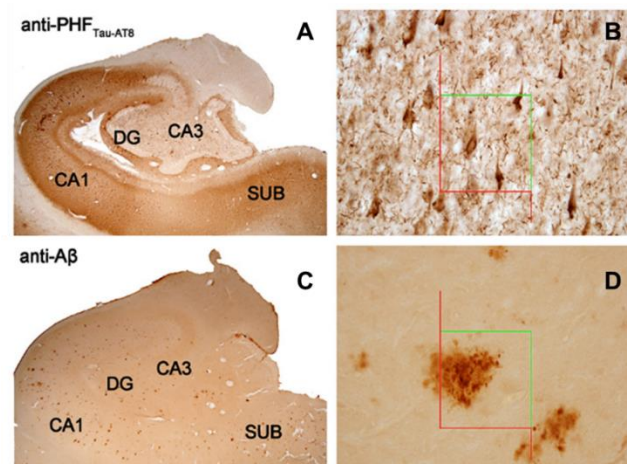


Figure 3 : Marquage hippocampique provenant d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (Furcila et al., 2019).

A gauche, des images à faible grossissement de la formation hippocampique montrant les sections avec un anticorps anti-PHF (A) et anticorps anti-A β (C). A droite, images à fort grossissement de l'aire CA1 de la corne d'Ammon montrant des neurones en dégénérescence (B) et des plaques amyloïdes (D).

En plus de ces deux lésions, une atrophie cérébrale est décelée qui peut aller jusqu'à une perte de volume annuelle graduelle de 4% au niveau de l'hippocampe selon le statut et les niveaux du déclin cognitif (**figure 4**) (Jack et al., 2000).

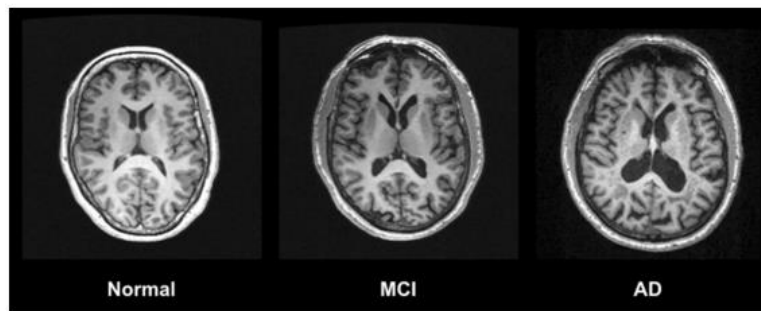


Figure 4 : IRM pondérée en T1 utilisant une séquence MPAGE (Magnétisation Prepared Rapid Gradient Echo).

Une diminution du volume de substance grise chez un patient atteint de MA comparé à un cas MCI et à un contrôle sain (normal) (Chandra et al. 2019).

5.2 Diagnostic clinique

5.2.1 Test cognitifs

Si la MA entraîne une détérioration des capacités cognitives chez les malades, il est nécessaire de pouvoir évaluer ce paramètre. L'évaluation du statut mental du patient, un paramètre compliqué à évaluer avec exactitude, repose donc sur les besoins du patient et sur le jugement du praticien qui le suit. Il existe différents tests dont le plus connu et utilisé est le Mini-Mental State Examination (MMSE) (Arevalo-Rodriguez et al., 2015). Il nécessite une dizaine de minutes selon les cas et a une sensibilité de 81% et une spécificité de 86,2% (Tsoi et al., 2015). D'autres tests existent comme le Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (Smith et al., 2007) qui a comparablement les mêmes performances que le MMSE, ou encore le Mini-cog (Borson et al., 2003). Ces tests reposent sur des séries de questions permettant d'évaluer différents paramètres tels que l'attention, les fonctions exécutives, l'agnosie, le langage, la mémoire, le repérage spatial, l'orientation, la praxie et la prosodie. L'évaluation dépend du jugement du praticien et nécessite au moins l'atteinte de deux fonctions cognitives différentes pour valider un diagnostic d'atteinte cognitive. Les tests de comportement sont rapides et utiles pour les médecins pour pouvoir déceler la maladie avant qu'elle n'arrive à un stade modéré à sévère. Ils permettent d'orienter le patient vers des examens complémentaires comme l'imagerie cérébrale ou la mesure de biomarqueurs dans les fluides biologiques.

5.2.2 Marqueurs d'évaluation

Il existe à ce jour des marqueurs permettant d'évaluer la progression de la maladie comme la mesure de l'atrophie cérébrale à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Chandra

et al. 2019), l'activité synaptique ou encore la charge amyloïde (Marcus et al., 2014) et les dépôts de Tau grâce à la Tomographie à émission de positons (TEP) (Okamura et al., 2014) (**figure 5**). Ces techniques sont des moyens non invasifs pour la détection de la maladie d'Alzheimer. Une autre méthode non invasive et moins couteuse est l'électroencéphalographie pour mesurer l'activité cérébrale du cerveau (Rossini et al., 2020).

Des analyses de biomarqueurs peuvent être couplées à ces techniques d'imagerie et corrélées à l'évolution de la maladie (**figure 5**). L'agrégation des protéines Tau et A β dans la maladie d'Alzheimer affecte la composition des fluides biologiques. Ainsi, la mesure des niveaux des protéines Tau (totale ou sous sa forme phosphorylée) et A β dans le liquide cérébro-spinal (LCS) ou dans le sang constituent des biomarqueurs d'utilité pour déceler la maladie (Ashton et al., 2020; Barthélémy et al., 2020).

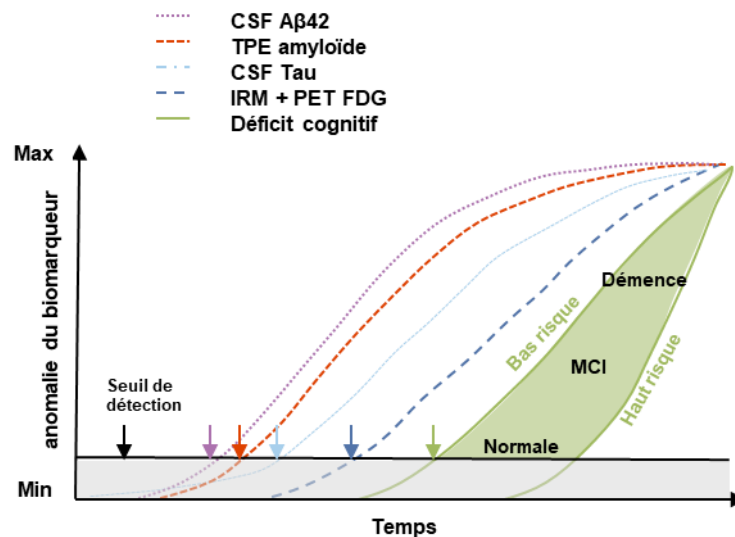


Figure 5 : Schématisation d'un modèle de corrélation entre l'évolution des biomarqueurs de MA au cours du temps et le risque d'occurrence de la maladie.

Le seuil de détection de chaque biomarqueur est marqué par une flèche correspondant à l'intersection de sa courbe avec la limite de la zone de changements physiopathologiques anormaux indétectables (zone grise). Le dépôt d'A β augmentant au-delà du seuil de détection peut être observé par TEP amyloïde (flèche rouge) ou par LCS A β 42 (représente réellement une diminution dans le LCS ; flèche violette) ce qui induit l'accélération de la Tauopathie, les niveaux de Tau dans le LCS sont modélisés en bleu clair. Plus tard, on peut observer les changements au niveau du TEP FDG et IRM modélisés en bleu foncé. L'apparition des troubles cognitifs est visible en vert. La zone de risque dépendante de l'individu diagnostiqué est déterminante pour la réponse cognitive. FDG : fluorodeoxyglucose. Modifiée de Jack et al., 2013.

Partie 2 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

1 Neuropathologie

La MA, qualifiée de double protéinopathie (maladies causées par des conformations et structures anormales de protéines), est due à l'accumulation dans le cerveau de deux protéines formant deux types de lésions : les plaques amyloïdes qui surviennent suite à l'accumulation du peptide amyloïde et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) dues à l'accumulation d'une protéine associée aux microtubules, la protéine Tau.

Les deux lésions suivent des chemins différents de propagation dans le cerveau vieillissant. La propagation des DNF a tendance à commencer au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal pour s'étendre vers les régions corticales (**figure 6B**) (Ogomori et al., 1989) alors que les plaques amyloïdes démarrent au niveau du néocortex pour s'étendre au niveau des régions allocorticales, les noyaux diencephaliques, le striatum et les noyaux cholinergiques et le tronc cérébral pour enfin couvrir tout le cerveau (**figure 6A**) (Thal et al., 2002). Des analyses par TEP de Tau et A β dans les stades préliminaires de la MA ont montré que même si les deux lésions sont concentrées dans des régions différentes du cerveau, il s'avère qu'elles se croisent au niveau du lobe temporal inférieur et latéral ainsi que le cortex entorhinal ce qui suggérerait des mécanismes d'interaction entre les deux protéines à des stades précoces (Braak & Braak, 1991; Jucker & Walker, 2011).

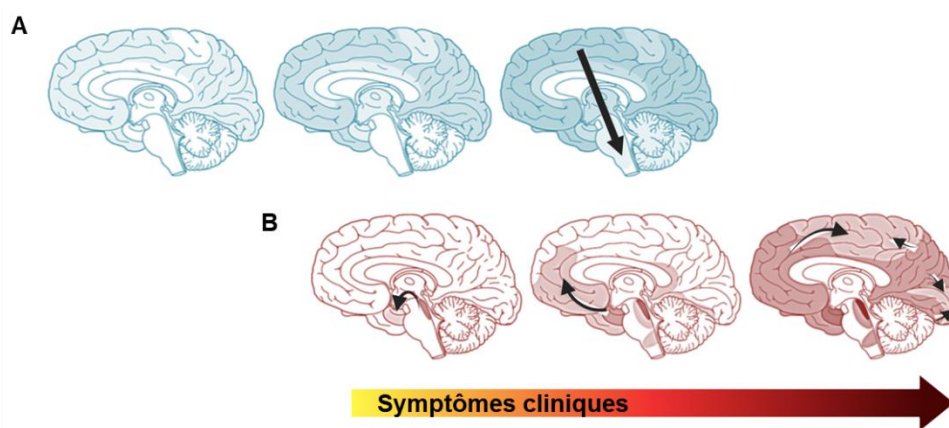


Figure 6 : Progression stéréotypée des lésions Tau et A β .

(A) Progression des plaques amyloïdes à partir du néocortex vers l'ensemble du cerveau. (B) L'évolution spatiale des DNF à partir de l'hippocampe et des régions entorhinales vers les cortex corrèle avec l'aggravation des symptômes cliniques dans la MA. Adaptée de Jucker & Walker, 2011.

La MA est une maladie multi-composante, avec des dommages neuronaux (altération synaptique, mort neuronale), une inflammation (réactivité astrocytaire, activation microgliale) en plus de l'accumulation de Tau et du peptide amyloïde.

2 Les dépôts amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont issues de l'accumulation extracellulaire de formes pro-agrégatives et potentiellement toxiques du peptide amyloïde bêta ($A\beta$).

2.1 Le précurseur de peptide amyloïde (APP)

2.1.1 Génétique de l'APP

L' $A\beta$ résulte du clivage séquentiel de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP), une protéine transmembranaire concentrée au niveau des synapses neuronales et codée par le gène APP localisé sur le chromosome humain 21q21.3 (**figure 7**). Cette protéine est produite au niveau des neurones, des cellules endothéliales, des cellules sanguines mais aussi des astrocytes. APP et les APLP (*APP-like proteins*) sont codés par des gènes de la même famille.

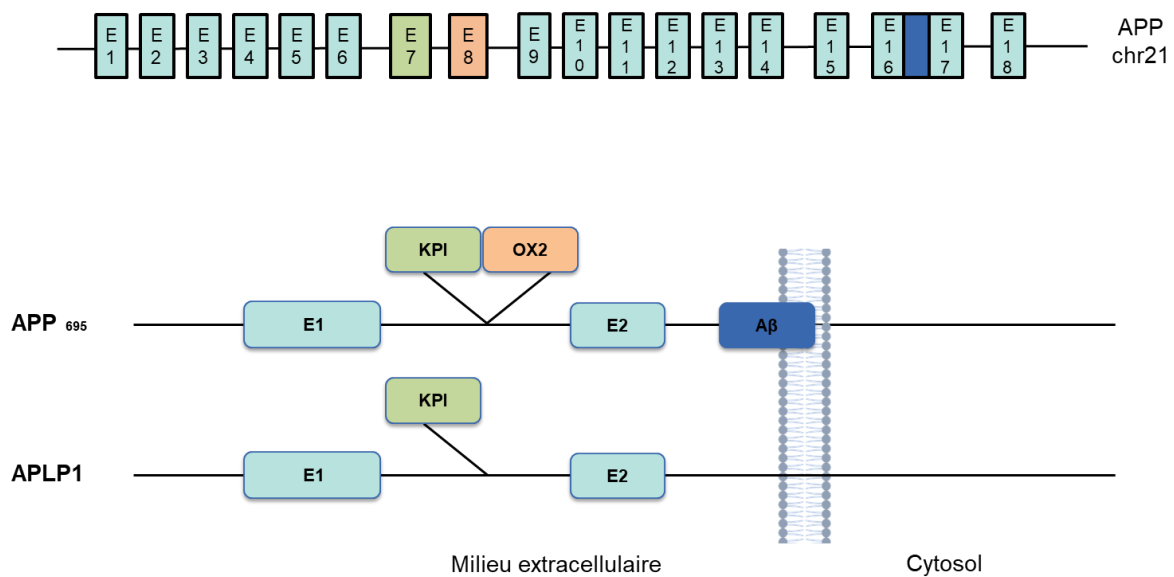


Figure 7 : Structure conservée de la famille des protéines APPs.

Le gène qui code les APP est situé sur le chromosome 21 et est constitué de 18 exons. APP et ces homologues APLP possèdent une structure similaire qui inclut le domaine E1 (bleu clair), une région acide et le domaine E2. Le domaine inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz (KPI en vert) et OX2 (en orange) est inséré avant le début du domaine E2 (bleu clair) et est présent uniquement sur les isoformes les plus longues entre le domaine acide et le domaine E2 (KPI présent sur APP751, APP770 et APLP2 ; OX2 présent uniquement au niveau de APP770). Le domaine AICD est intracellulaire. Une région transmembranaire est présente au niveau des APLP et des APPs mais seulement les APPs du peptide amyloïde (bleu foncé). Adaptée de Gabriele et al., 2022.

Le gène APP possède 18 exons, les exons 7, 8 et 15 sont épissés et donnent lieu à différentes isoformes de l'APP dont la taille varie entre 365 à 770 acides aminés, les formes majoritaires étant APP695 qui est exprimée majoritairement au niveau du système nerveux central, APP751 et APP770.

2.1.2 Structure de l'APP

Au niveau structural, l'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de 110-130 kDa constituée d'un domaine transmembranaire à passage unique, d'un grand domaine N-terminal extracellulaire (ectodomaine) et d'un domaine C-terminal intracellulaire plus court qui contient un domaine Tyrosine–Glutamic Acid–Asparagine–Proline–Threonine–Tyrosine (YENPTY). L'APP et les APLP partagent une structure similaire avec des régions conservées dont le domaine intracellulaire C-terminal et des domaines E1 (domaine riche en cystéine) et E2 (domaine riche en hélices α) extracellulaires. L'APP695 neuronale est dépourvue de deux domaines KPI (domaine inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz) et OX2 impliqués dans les interactions protéiques (**figure 7**) (Gabriele et al., 2022).

2.1.3 Clivage et voie de synthèse du peptide amyloïde

Le clivage protéolytique d'APP peut s'effectuer par deux voies différentes : la voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique (**figure 8**). La voie amyloïdogénique commence par le clivage de l'APP par la BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1 ou β -secrétase) donnant lieu à sAPP β et C99 (Fragment Carboxy-terminal transmembranaire CTF β), ce dernier est clivé à son tour par la γ -secrétase qui implique BACE1 donnant lieu au domaine intracellulaire de l'APP (AICD) et au peptide A β (**figure 8**). Le fragment C99 peut être protéolysé à différents niveaux donnant différentes isoformes du peptide A β allant de 38 à 43 acides aminés, isolées et purifiées pour la première fois en 1984 (Glenner and Wong, 1984). Une autre voie non amyloïdogénique issue du clivage par l' α -secrétase, principalement ADAM-10 (*Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) (Kuhn et al., 2010) donne par ailleurs lieu à sAPP α et C83 (Fragment Carboxy-terminal CTF α) qui donne par clivage par la γ -secrétase (composé de 4 protéines distinctes : préséniline 1 (PSEN1), préséniline 2 (PSEN2), nicastrine et AP-H1) le peptide P3 extracellulaire et AICD intracellulaire. L'activité de type α -secrétase diminue avec la progression de la maladie, favorisant ainsi la voie amyloïdogénique (Postina, 2004).

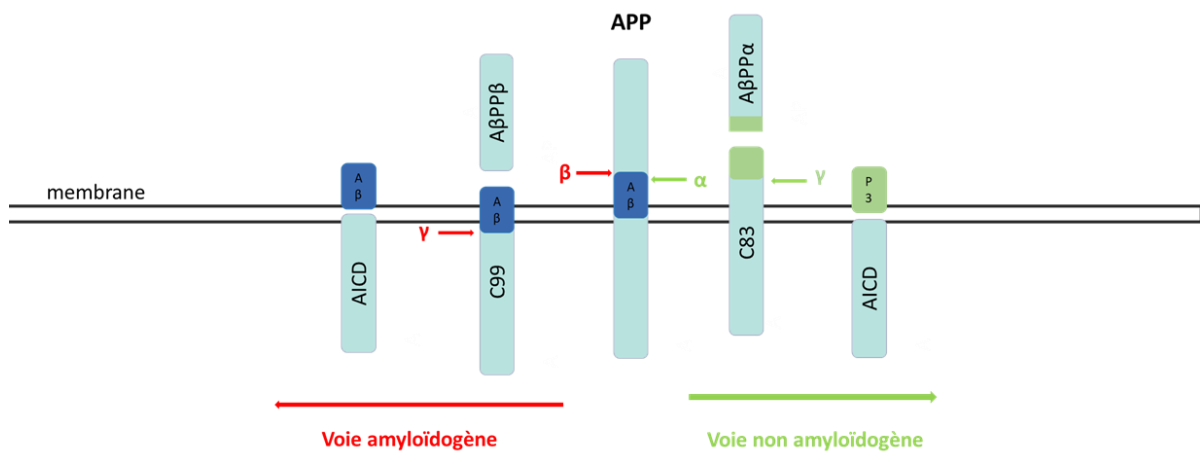


Figure 8 : Clivage de APP par les secrétases selon la voie amyloïdogène et non- amyloïdogénique.

Dans la voie non-amyloïdogène (en vert), le clivage d'APP par α -secrétase se fait au niveau du domaine A β . Selon cette voie, un autre peptide P3 est généré par clivage du fragment C83 avec la γ -secrétase. D'autres fragments sont générés par cette voie tels que le fragment APPs- α ainsi que le domaine intracellulaire AICD qui est aussi généré par la voie amyloïdogène (en rouge). Le clivage d'APP par la β -secrétase donne 2 fragments différents APPs- β et C99. C'est ce dernier qui est clivé par γ -secrétase pour libérer le peptide A β (fragment en bleu foncé).

2.1.4 Fonctions de l'APP et de ses catabolites

Si le rôle pathologique de l'APP est très étudié, ses fonctions physiologiques le demeurent moins. L'APP est connu pour moduler la prolifération et la survie cellulaire, la migration et la motilité ainsi que la croissance neuritique *in vitro* (Oh et al., 2009) et *in vivo* (Young-Pearse et al., 2007) (**figure 9**).

Le domaine YENPTY est responsable des interactions protéiques de l'APP. Son interaction avec les protéines partenaires nécessite la présence d'un domaine de liaison à la phosphotyrosine. Un tel domaine est présent au niveau des protéines partenaires les plus connues de l'APP telles que X11 (*neuronal adaptor protein*) et Fe65 au niveau de domaines d'interaction différents (Lambrechts et al., 2000; Feng and Zhang, 2009). Ces dernières interagissent avec toutes les APLPs (*Amyloid Precursor-Like Protein*). L'APP interagit aussi avec le récepteur Notch2 et son homologue Notch1 (Chen et al., 2006), protéines transmembranaires qui jouent un rôle dans divers processus du développement en contrôlant les décisions relatives au devenir cellulaire. D'autres partenaires de l'APP incluent les collagènes, netrin-1, la laminine, le peptide A β ainsi que d'autres membres de la famille APP comme APLP1 et APLP2.

Des études ont mis en évidence des activités neuroprotectrices de l'ectodomaine sAPP α . Celui-ci est connu pour son interaction avec le récepteur métabotrope du neurotransmetteur inhibiteur GABA (*γ -aminobutyric acid*) et provoquer la suppression des vésicules synaptiques et la modulation de la transmission synaptique chez les souris (Rice et al., 2019). sAPP α est

également impliquée dans la protection contre les dommages hypoglycémiques ainsi que pour l'activation microgliale (Barger and Harmon, 1997) ou encore la croissance axonale, la plasticité et la mémorisation (Mattson et al., 1993; Meziane et al., 1998). Enfin, ce fragment est connu pour son rôle neurotrophique, neuroprotecteur et synaptogène (Tackenberg and Nitsch, 2019; Habib et al., 2021). De façon contradictoire, l'ectodomaine sAPP β , différent de 16 derniers acides aminés C-terminaux, n'est pas impliqué dans la neuroprotection et dans la potentialisation à long terme (LTP) (Taylor et al., 2008). Celui-ci interagit avec le récepteur cytoplasmique de mort cellulaire DR6 et la caspase 6 pour induire la neurodégénérescence (Nikolaev et al., 2009).

De plus, l'APP possède huit sites potentiels de phosphorylation dans son domaine cytoplasmique parmi lesquels le site de la thréonine 668, dont la phosphorylation est liée à la production d'A β en augmentant le β -clivage de l'APP (Feyt et al., 2007) et en favorisant la dégénérescence neuronale (Chang et al., 2006).

D'autres fonctions pro-apoptotiques et neurotoxiques ont aussi été associées aux produits de clivages de l'APP tels que l'AICD qui est fréquemment associé au noyau (Nakayama et al., 2008; Bukhari et al., 2017), les CTF (Tamayev et al., 2012) et P3 (Wei, 2002). L'accumulation de C99 s'avère aussi neurotoxique (Bourgeois et al., 2018).

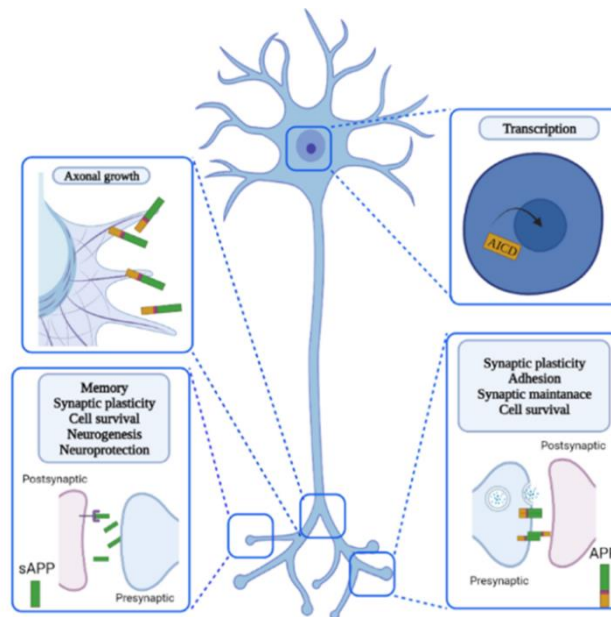


Figure 9 : Représentation schématique des rôles physiologiques du peptide amyloïde.

APP joue un rôle dans la maintenance et la plasticité synaptique, la régulation de la transcription, la croissance axonale et possède un rôle neuroprotecteur. Adaptée de Gabriele et al., 2022.

2.2 *Dérégulation de la clairance et de la balance entre la voie amyloïdogénique et la voie non-amyloïdogénique*

Des études ont montré que des protéases comme la néprilysine, l'enzyme dégradant l'insuline et la P-glycoprotéine (RAGE) ainsi que la protéine 1 liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LRP1) sont impliqués dans la dégradation du peptide amyloïde et son transport par endocytose (Leissring et al., 2003; Cirrito et al., 2008). D'autres études spéculent que dans les stades précoces de la maladie, l'activité de BACE1 est augmentée (Holsinger et al., 2002) ce qui active la voie amyloïdogénique et cause les dépôts amyloïdes.

Les dépôts amyloïdes peuvent être localisés (dépôts présents dans un seul organe) ou systémiques (divers organes et tissus). Les manifestations cliniques sont hétérogènes et peuvent être influencées par des facteurs génétiques et environnementaux (Picken, 2020). Les dépôts amyloïdes peuvent contenir en plus de l'amyloïde fibrillaire des composants comme les glycosaminoglycanes (GAGS), l'apolipoprotéine E (ApoE) et le sérum amyloïde P (SAP) (Westermarck et al., 2007).

2.3 *Le peptide amyloïde*

2.3.1 *Fonctions physiologiques des peptides amyloïdes*

Des concentrations physiologiques d'A β sont requises pour induire une LTP au niveau de la synapse et contribue donc à la plasticité synaptique et au processus d'apprentissage (Puzzo et al., 2011). Des concentrations d'A β 42 de l'ordre du picomolaire augmentent le relargage de neurotransmetteurs, l'ancrage vésiculaire, la densité post-synaptique ainsi que l'expression des protéines impliquées dans la conversion de la LTP de la phase précoce à la phase tardive (Gulisano et al., 2019). En plus de son interaction avec l'acétylcholine, A β peut aussi stimuler les récepteurs glutamatergiques. C'est pour cette raison que sa présence à forte concentration peut interférer avec la clairance du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) par les astrocytes au niveau extracellulaire. De la même façon que son rôle de maintien des synapses, les monomères β -amyloïdes possèdent des propriétés neuroprotectrices et neurotrophiques (Yankner et al., 1990; Giuffrida et al., 2009).

De plus, il a été admis que l'amyloïde participe à l'inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse (Pavliukeviciene et al., 2019). Même si les études cliniques ne supportent pas l'idée d'un rôle actif d'A β dans la suppression de cancer, celui-ci pourrait jouer un rôle indirect d'interception des virus oncogènes (Parkin, 2006). Dans le même sens, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les oligomères d'A β pouvaient former des fibrilles, piéger les agents pathogènes et détruire la membrane cellulaire (Gosztyla et al., 2018). Ainsi, différents travaux se basent maintenant sur l'hypothèse que l'amyloïdose serait une réponse immunitaire innée et

proposent qu'un dépôt accru d'A β , causé par l'activation continue de cette voie par une infection chronique récurrente, puisse conduire au développement de la MA.

Plusieurs recherches ont montré qu'en cas de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'A β peut se lier aux composants inflammatoires et neuroactifs pour empêcher leur propagation et ainsi venir s'agréger et servir de « croûte vasculaire » qui serre les capillaires endothéliaux ensemble en cas de fuite au niveau de la BHE. Une perte de capacité à sceller les fuites dans la BHE entraîne une augmentation du nombre de micro-hémorragies et d'œdème cérébral (ARIA) qui peuvent être observés par IRM et qui est maintenant devenu une préoccupation majeure dans les cas d'immunisation A β (Brothers et al., 2018). Cela étant, cibler la production ou l'élimination d'A β plus tôt au cours de la MA est susceptible d'être associé aux mêmes événements indésirables avec un risque plus accru et une réduction de la capacité de récupération du patient.

2.3.2 Effets pathologiques des peptides amyloïdes

Dans les premiers stades de développement de la MA, on observe une diminution de la concentration d'A β 42 dans le LCS et une augmentation accrue au niveau du cerveau (Steinerman et al., 2008; Shaw et al., 2009). Ainsi la clairance d'A β et son transport à partir du cerveau se voient altérés (Mawuenyega et al., 2010). Pour qu'il puisse assurer ses fonctions physiologiques, le peptide amyloïde doit garder des concentrations allant de 200 à 1500 pM dans le LCS (Giedraitis et al., 2007).

On retrouve le peptide amyloïde sous plusieurs formes qui varient de la forme monomérique, oligomérique, protofibrillaire et fibrillaire qui s'assemble en dépôts amyloïdes (**figure 10**). Cette

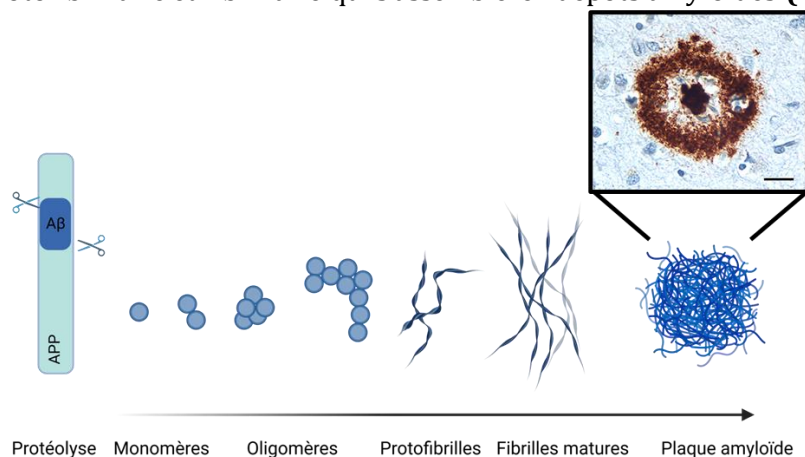


Figure 10 : Processus de formation des plaques amyloïdes.

Les monomères solubles de peptide amyloïde peuvent s'assembler en des structures plus complexes pour former des oligomères, des protofibrilles et des fibrilles matures en feuillet- β qui constituent le corps des plaques amyloïdes.

accumulation en plaques serait un mécanisme de protection contre l'excès d'oligomères toxiques libérés par une activité neuronale accrue (Reiss et al., 2018). Ainsi, la forme d'A β toxique pour les neurones est encore controversée. Des études ont montré la toxicité d'assemblages oligomériques de l'ordre du picomolaire (Shankar et al., 2008), la forme la plus cytotoxique étant la forme A β 42 (Allan Butterfield, 2002). D'autres études ont aussi montré la neurotoxicité *in vitro* de la forme fibrillaire d'A β par apoptose induite par réactivité oxydative (Deshpande, 2006).

2.4 Les différents types de dépôts amyloïdes

Par révélation immunohistologique, on observe des dépôts parenchymateux d'A β qui sont des dépôts associés à d'autres protéines, lipides et cellules. L'ApoE, essentiellement produite par les astrocytes constitue un des composants les plus communs des dépôts amyloïdes, sa densité corrèle avec l'immunoréactivité des lésions amyloïdes (Uchihara et al., 1996). Des études ont aussi montré la présence de clusterine (CLU), quelques ions métalliques comme le zinc ou le fer (Stoltenberg et al., 2005; Collingwood et al., 2008) mais aussi des composantes de la matrice extracellulaire comme ICAM1 (Verbeek et al., 1994), la thrombospondine (Buée et al., 1992), les héparanes sulfates protéoglycanes (Snow and Wight, 1989), des enzymes lysosomales comme la Cathepsine D (Cataldo and Nixon, 1990).

Généralement, il existe différents types de dépôts d'A β :

- **Dépôt diffus** : L'immunoréactivité de ces plaques est faible et dépendante de la qualité de l'immunohistochimie réalisée. Elles ont un diamètre compris entre 50 à 100 μ m (**figure 11d**). Ce genre de plaques est souvent retrouvé chez des sujets non atteints de déficits cognitifs et souvent associés à des dépôts d'ApoE (Güntert et al., 2006).
- **Dépôt focal** : Il s'agit du coeur dense des dépôts amyloïdes qui présente souvent une forme plutôt sphérique (**figure 11b**) et qui est caractérisé par la présence d'A β 40 majoritairement (Güntert et al., 2006). Ce coeur dense est révélé facilement avec des colorations au Rouge Congo ou à la thioflavine-S et est souvent entouré de microglies activées (Arends et al., 2000).
- **La couronne neuritique** : Le coeur dense des dépôts amyloïdes est souvent séparé du dépôt diffus par un halo clair (**figure 11c**) qui constitue une sorte de « couronne » (**figure 11a**). La microglie est souvent logée dans cet espace intermédiaire alors que la couronne contient des composants neuritiques et astrocytaires. Le dépôt focal ainsi que la couronne neuritique qui l'entoure constituent ainsi ce qu'on appelle une plaque neuritique. Les neurites dystrophiques qui constituent la couronne de la plaque contiennent de la lipofuscine, des mitochondries en dégénérescence ainsi que de la Tau malconformée (développé dans la partie Tau).

- **Un type spécial de dépôt amyloïde** est l'accumulation en forme de coton (**figure 11f**) qui est facilement détectable en coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Ces structures sont composées d'A β 42, contiennent des composants gliaux clairsemés et sont dépourvues de couronne neuritique.
- **Dépôts vasculaires** : L'accumulation d'A β peut se faire au niveau des parois des vaisseaux sanguins (**figure 11e**). Cette accumulation est souvent associée à une angiopathie amyloïde cérébrale (CAA), une maladie qui survient fréquemment chez les personnes âgées, démentes ou non et impliquant préférentiellement les vaisseaux des leptoméninges et du cortex. Les cas de CAA sont souvent associés à des hémorragies lobaires (Vonsattel et al., 1991).

Les dépôts sont principalement extracellulaires et sont reconnus par leur affinité pour le rouge Congo et à leur biréfringence jaune-vert en lumière polarisée (Dhenain et al., 2002). Les dépôts diffus à eux seuls ne provoquent que peu ou pas de troubles intellectuels. Il pourrait s'agir, sur le plan clinico-pathologique, d'un vieillissement anormal ou d'un stade précoce de la MA (Hardy, 1992).

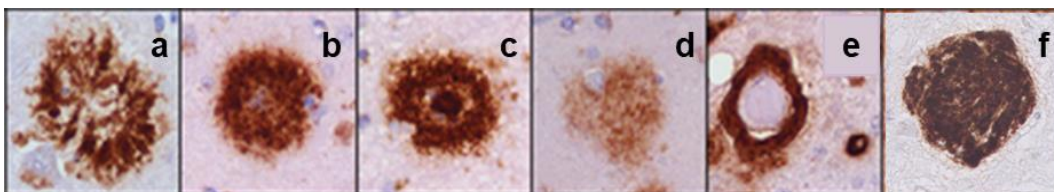


Figure 11 : Marquage des différents dépôts amyloïdes en immunohistochimie.

Les plaques amyloïdes se présentent sous différentes tailles et formes. La plupart des dépôts évoluent sous forme de structures globulaires avec ou sans noyau dense. Plaque fibrillaire (a), plaque compacte (b), plaque à coeur dense (c), plaque diffuse (d), dépôt amyloïde vasculaire (e), plaque en laine de coton (f). Marquage d'A β effectué à l'anticorps 4G8 (a-e) et 6F/3D (f) pour les plaques et CAA. Adapté de Den Haan et al., 2018 et Boon et al., 2020.

2.5 Neurotoxicité des dépôts amyloïdes

Si l'amyloïde remplit plusieurs fonctions physiologiques essentielles, ce sont les niveaux de concentrations des différentes isoformes produites par rapport à sa clairance qui font que les peptides amyloïdes finissent par s'agréger dans le milieu extracellulaire et induire la neurotoxicité. En effet, l'agrégation d'A β est un événement majeur dans le développement de la MA. Bien que l'A β 40 est la forme la plus abondante *in vivo* (Haass and Selkoe, 1993), plusieurs études ont montré que A β 42 est retrouvé le plus souvent dans les dépôts amyloïdes, celui-ci étant plus neurotoxique qu'A β 40. Ainsi une augmentation du ratio A β 42/A β 40 affecte les propriétés biologiques de l'amyloïde ainsi que l'activité synaptique et la viabilité neuronale en étant responsable de la stabilisation des oligomères toxiques. L'équilibre entre les deux formes d'A β est

déterminant dans l'apparition de ces propriétés toxiques (Kuperstein et al., 2010). Il a même été montré qu'A β 40 peut empêcher l'oligomérisation d'A β 42 *in vitro* et *in vivo* (Murray et al., 2009).

2.6 Propagation d'A β

2.6.1 Caractère prion d'A β

L'hypothèse d'une progression des lésions dans la MA, la maladie de Parkinson, la démence frontotemporale ou d'autres neuropathologies liées à l'âge implique une propagation des protéines en question d'un neurone à un autre. Cette propagation s'effectue d'une région du cerveau à une autre, d'un hôte à un autre ou à partir d'inoculation qui suggère une propagation "prion-like" (Selkoe and Hardy, 2016).

La plupart des maladies neurodégénératives sont appelées protéinopathies du fait du caractère de type prion de ces protéines qui sont non seulement capables de s'agréger mais aussi d'être sécrétées et « infecter » des cellules voisines. Ainsi, ces protéines peuvent adopter une structure tridimensionnelle particulière et recruter des protéines sauvages auxquelles elles confèrent le mauvais repliement pour favoriser la propagation dans un premier lieu et l'agrégation dans un second lieu (**figure 12**) (Aguzzi and Rajendran, 2009 ; Walker et al., 2016).

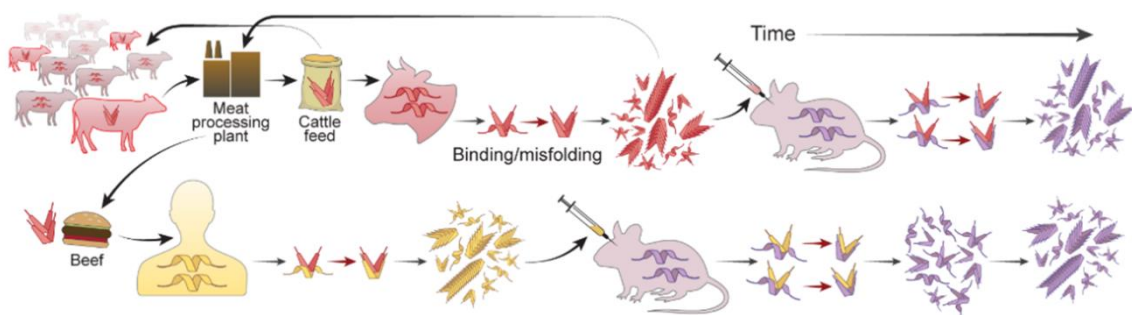


Figure 12 : Mode de transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) entre espèces.

L'ingestion de la protéine prion mal repliée est responsable de l'ESB chez le bovin (rouge). L'ingestion chez l'humain (jaune) ou l'inoculation dans la souris (violet) entraîne un repliement des protéines prion normales endogènes qui provoque la pathologie. Bien que leurs structures primaires soient différentes selon l'espèce, les protéines prions prennent des conformations pathologiques qui donnent les mêmes symptômes cliniques. (Carlson et al., 2021).

Dans les années 1980, des dépôts amyloïdes ont été identifiés chez des patients décédés de la maladie de Creutzfeldt-Jacob iatrogène après une longue exposition à l'hormone de croissance (GH) dérivée de cadavres. L'analyse des lots de GH a révélé entre 1974 et 1988 la présence de contaminants amyloïdes (Duyckaerts et al., 2018). Le suivi de ces patients suggère la transmission de la pathologie amyloïde. En effet, la tendance de l'amyloïde à s'autoagréger est un élément important dans son rôle pathologique, sa polymérisation au niveau des plaques séniles et au

niveau cérébrovasculaire est une caractéristique des β -amyloïdoses cérébrales telle que la MA (Selkoe, 1999).

Le potentiel proagrégatif de l'amyloïde a été prouvé par induction de dépôts amyloïdes par inoculation intracérébrale unique d'extraits de tissus contenant des agrégats d'amyloïde tels que des cerveaux atteints de la MA (Kane et al., 2000) des extraits de souris transgéniques pour APP ou encore des peptides synthétiques A β afin d'accélérer ou induire la propagation chez des souris (Stöhr et al., 2012; Watts et al., 2014). Ces travaux prouvent qu'un agent de nucléation est donc présent dans ces lysats de cerveaux atteints de la MA qui serait capable de se propager d'une façon comparable aux prions qui possèdent une capacité de multiplication et d'autopropagation à la fois dans et entre organismes (Prusiner, 2012; Rasmussen et al., 2017).

2.6.2 Espèces pro-agrégatives d'A β et hétérogénéité clinique

Les études s'enchainent pour déterminer les espèces d'A β qui s'autopropagent afin de déterminer de potentielles cibles thérapeutiques pour arrêter la propagation des dépôts amyloïdes qui conduisent à la MA. Ainsi ces différentes études ont présenté la preuve de la capacité d'induction et d'autopropagation de l'amyloïde. Si certaines ont montré la capacité pro-agrégative d'agrégats d'A β dérivés de cerveaux ou des agrégats composés d'A β synthétiques (Stöhr et al., 2012), d'autres ont même pu montrer une induction d'amyloïdose chez des souris transgéniques après une longue incubation après inoculation d'extraits riches en amyloïdes par voie intra péritonéale (Eisele et al., 2010).

Les dépôts amyloïdes peuvent aussi être induits avec des niveaux physiologiques d'APP. Ruiz-Riquelme et collaborateurs ont montré une induction d'agrégats d'A β issus de cerveaux de patients atteints de la MA ou de souris transgéniques chez des souris qui ne surexpriment pas APP. Ainsi la propagation « *prion-like* » de l'amyloïde ne requiert pas des niveaux d'APP élevés. De ce fait, et de façon similaire aux prions, parmi leurs caractéristiques, une des plus importantes est leur capacité à répliquer des souches inoculées distinctes selon l'information biologique et conformationnelle des agrégats protéiques inoculés. Ainsi, des souris injectées avec des lysats issus de patients atteints d'une forme familiale à mutation suédoise (APP KM670/671NL) présentent une pathologie différente par rapport à des souris injectées avec des lysats de provenance familiale à caractère arctique (APP E693G) ou d'autres provenant de formes sporadiques de MA. Selon la forme inoculée, l'hôte présentera une accumulation d'isoformes d'A β et des dépôts cérébraux morphologiquement caractéristiques (Watts et al., 2014). L'hétérogénéité clinique et pathologique observée chez les patients atteints de MA peut ainsi être expliquée. Cette notion implique que la première souche amyloïde qui émerge dans le cerveau dicte la conformation, la propagation anatomique et le rythme des dépôts formés (Condello and Stöehr, 2018).

Les protofibrilles et les oligomères d'A β restent considérés comme les formes les plus pathogéniques dans la MA, bien que l'accumulation intraneuronale d'A β a aussi été décrite dans le cerveau mais sa pertinence dans la maladie reste controversée (Gouras et al., 2010).

3 Les dégénérescences neurofibrillaires

3.1 Génétique de la protéine Tau

Chez l'homme, Tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules ou MAPs (*Microtubule Associated Proteins*). Elle est codée par le gène MAPT (*Microtubule-Associated Protein Tau*) localisé sur le chromosome 17 en position q21. Sa séquence est constituée de 16 exons : les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, et 12 sont des exons constitutifs alors que les exons 2, 3, 4A, 6, 8 et 10 sont des exons alternatifs (**figure 13**). Les exons 1 et 14, situés au niveau des extrémités 5'UTR (*Untranslated Transcribed Region*) et 3'UTR respectivement, ne sont pas traduits. L'exon 4A est limité aux neurones du système nerveux périphérique et de la rétine (Goedert et al., 1992). L'épissage alternatif du transcrit primaire du gène de Tau donne six isoformes différentes dans le cerveau adulte humain (**figure 13**) (Sergeant et al., 2008). Au niveau de sa structure, Tau possède une partie C-terminale basique composée de 3 ou 4 domaines de répétitions et de liaison aux microtubules (isoformes 3R et 4R) et une partie N-terminale acide (Wang and Mandelkow, 2016). Tau peut donc s'associer aux microtubules et contribuer à leur stabilisation au moyen de ses domaines de répétitions. L'épissage alternatif des exons 2 et 3 donne les isoformes 0N, 1N et 2N dans la partie N-terminale (**figure 13**) (Buée et al., 2000). L'isoforme 0N3R est produite seulement durant le stade foetal et correspond à l'isoforme la plus courte. L'inclusion de l'exon 3 est dépendante de celle de l'exon 2. La taille de la protéine Tau humaine varie entre 352 et 441 acides aminés selon les isoformes. L'ARN messager (ARNm) de la protéine Tau est majoritairement retrouvée dans les neurones (Avila et al., 2004) et en moindre mesure dans les astrocytes et les oligodendrocytes (Ahmed et al., 2011). On retrouve aussi la protéine Tau dans les tissus périphériques comme le cœur, le muscle, le pancréas, le foie ou encore les testicules (Gu et al., 2002; Mitchell et al., 2014). Chez la souris adulte, seules les isoformes 4R sont retrouvées (**figure 13**).

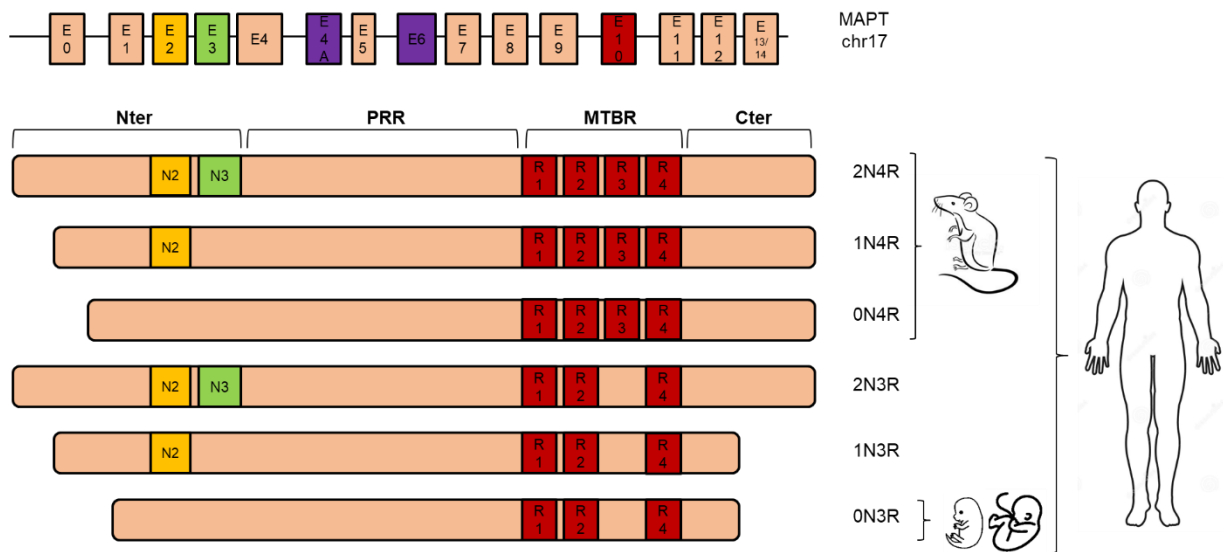


Figure 13 : Représentation schématique des isoformes de Tau issues du gène MAPT dans le SNC humain.

Le gène humain MAPT est situé sur le chromosome 17 en position q21. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13/14 sont constitutifs alors que les exons 2 (en jaune), 3 (en vert) et 10 (en rouge) donnent lieu par épissage alternatif du transcrit primaire à 6 isoformes de Tau dans le cerveau adulte humain. L'épissage alternatif de l'exon 2 et 3 en région amino-terminale (Nter) donne les isoformes 0N, 1N et 2N et l'épissage alternatif de l'exon 10 au niveau du domaine de liaison aux microtubules (MTBR) dans la région Carboxy-terminale (Cter) donne les formes 3R par exclusion et les formes 4R par inclusion. Les exons 4A et 6 (en violet) sont épissés de façon alternative dans le SNP (système nerveux périphérique) et les exons 6 et 8 sont non transcrits dans le cerveau humain. PRR: domaine central riche en proline.

3.2 Structure de la protéine Tau

D'un point de vue structurel, la protéine Tau est constituée de quatre domaines avec des propriétés biochimiques différentes (Sergeant et al., 2008). 1) Un domaine essentiellement acide appelé « domaine de projection » qui comporte le domaine Nter associé à 2) un domaine central riche en proline (PRR) permettant l'interaction avec différents éléments du cytosquelette et la régulation de l'espacement entre les microtubules (Chen et al., 1992). 3) Une partie Cter riche en résidus basiques comportant les domaines de répétitions qui interviennent dans la liaison de Tau aux microtubules d'où l'appellation 4) domaine de liaison aux microtubules (MTBR) (**figure 13**) (Kolarova et al., 2012).

La protéine Tau possède une grande proportion de résidus basiques qui lui confèrent un caractère hydrophile et une structure désordonnée (Mandelkow and Mandelkow, 2012; Habchi et al., 2014; van der Lee et al., 2014; Wright and Dyson, 2015). Tau est néanmoins capable de former des structures secondaires transitoires en hélice alpha, poliproline II dans la région PRR ou encore des feuillets β dans le domaine MTBR (Sibille et al., 2012).

3.3 Fonctions physiologiques de la protéine Tau

Depuis sa découverte en 1975 (Weingarten et al., 1975), Tau est décrite comme un facteur permettant la stabilisation de la tubuline en microtubules. La majorité des recherches se sont concentrées sur son rôle de stabilisation des microtubules. Tau est aussi retrouvée dans le noyau, la membrane plasmique, les mitochondries, le réticulum endoplasmique ainsi que l'appareil de Golgi (Farah et al., 2006). Tau participe également à la neurogenèse, à la synaptogenèse ainsi qu'à l'apprentissage et à la mémoire. Tau intervient aussi dans le contrôle moteur, le rythme circadien et l'anxiété et serait impliquée dans l'homéostasie du fer (**figure14**).

3.3.1 Dynamique microtubulaire, transport axonal et mitochondrial

Les microtubules sont des cylindres creux rigides composés de 13 protofilaments de sous-unités α et β de tubuline. Il existe deux principales protéines de liaison aux microtubules : MAP2 et Tau. Si MAP2 est spécifiquement exprimée au niveau des corps cellulaires et des dendrites, on retrouve plutôt la protéine Tau au niveau des axones (Melková et al., 2019). La liaison de Tau aux microtubules se fait au moyen de son domaine MTBR. La Tau 4R a plus d'affinité pour les microtubules que la Tau 3R. Il a été montré par cryomicroscopie électronique que les tandems de domaines de liaisons aux microtubules interagissent avec des dimères de tubulines α - β afin de stabiliser les polymères (Kellogg et al., 2018). Cependant, le mécanisme exact d'assemblage et de stabilisation des microtubules par Tau demeure non élucidé en raison de la dynamique du système et de la nature désordonnée de Tau (Devred et al., 2010; Maïo et al., 2014; Tsvetkov et al., 2019). Tau facilite aussi le transport de protéines et le trafic d'organites, comme la mitochondrie, le long des axones en régulant les protéines motrices comme la kynésine et la dynéine (Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006; Chaudhary et al., 2018).

3.3.2 Neurogenèse, synaptogenèse et plasticité

Cette dynamique microtubulaire à laquelle contribue la protéine Tau est extrêmement régulée et importante pour plusieurs activités cellulaires telles que la division, le transport intracellulaire ainsi que la polarité des cellules nerveuses. De ce fait, par son interaction aux microtubules, elle favorise le processus de différenciation neuronale et la croissance neuritique (Dawson et al., 2010). Tau joue un rôle dans la formation, la maintenance et la réparation de la myéline potentiellement via la régulation des microtubules (Klein et al., 2002). En effet, la démyélinisation est communément reportée dans les stades précoces de la MA et corrèle avec l'accumulation de Tau dans le cerveau.

Tau joue aussi un rôle dans la synaptogenèse. En effet, il a été démontré *in vitro* que la stimulation de neurones hippocampiques avec le facteur neurotrophique BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) augmente l'expression de Tau et la croissance des épines dendritiques (Chen et al., 2012).

Tau peut aussi être libérée dans la fente synaptique pour rejoindre un neurone post-synaptique ou les cellules gliales. Ainsi, la stimulation de l'activité neuronale induit l'activation du récepteur ionotropique activé par le glutamate (AMPA) (Pooler et al., 2013; Sokolow et al., 2015). Tau contribue à la maintenance de la dynamique de AMPAR au niveau des dendrites en conditions stimulées et non stimulées (Suzuki and Kimura, 2017). En effet, des études effectuées sur des souris MAPT KO montrent une neurogenèse altérée. Cette perte de fonction de Tau serait aussi responsable de la déficience synaptique et cognitive dans les cas pathologiques (Morris et al., 2013; Ma et al., 2014). En absence de régulation par les MAPs, une perte des protéines synaptiques ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale sont observées (Velazquez et al., 2018) .

Tau interagit aussi avec le récepteur au NMDA via l'interaction avec Fyn, une kinase de la famille Src (*nonreceptor tyrosine kinases*) localisée dans les radeaux lipidiques, et en régulant l'adressage de la sous-unité NR2B à la membrane (Klein et al., 2002; Ittner et al., 2010). Le recrutement de Tau et de la tubuline par la kinase Fyn activée est aussi une étape importante pour la myélinisation.

3.3.3 Contrôle moteur, rythme circadien et anxiété

Tau semble intervenir au niveau du cycle circadien (Cantero et al., 2010) mais aussi dans l'hyperactivité et l'anxiété. En effet, des études de délétion de Tau dans des modèles de souris montrent une hyperactivité et une anxiété accrue (Ikegami, 2000). Une autre caractéristique de ces modèles de souris est l'apparition d'un dysfonctionnement moteur (Li et al., 2014). Ceci suggère que la perte de fonction de Tau pourrait partiellement contribuer aux atteintes des fonctions motrices et du développement de caractéristiques de la maladie de Parkinson chez les individus atteints de ce trouble (Lei et al., 2012).

3.3.4 Homéostasie du fer

Un certain nombre de groupes stipulent que la dyshoméostasie du fer pourrait contribuer à la MA et à d'autres maladies neurodégénératives. Tau jouerait un rôle dans la régulation du transport cellulaire du fer (Lane et al., 2018). L'interaction se fait via un motif de liaison au fer situé dans le MTBR de la protéine Tau, le fer est exporté des neurones par la ferroportine (Ftpn), qui est stabilisée par un mécanisme encore inconnu impliquant Tau (Rao and Adlard, 2018).

3.3.5 Régulation de la transcription et des dommages à l'ADN

Tau est aussi présente dans le compartiment nucléaire (Loomis et al., 1990) et est capable de se lier et de stabiliser l'ADN en le protégeant des altérations de radicaux libres et des DNases (Sultan et al., 2011) ou encore de la dénaturation dans les conditions hyperthermiques en s'associant à l'ADN double-brin (ADNdb) *in vitro* (Hua et al., 2003). Les cassures de l'ADNdb sont souvent associées à la pathologie Tau, ces dernières sont fortement diminuées lorsque Tau est retrouvée

dans le noyau (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014). L'hypothèse est que Tau joue un rôle protecteur pour l'ADN. D'autres travaux portent aussi sur l'implication de Tau dans l'acétylation des histones et le maintien de l'hétérochromatine péricentromérique qui est altérée dans les cerveaux autopsiques de patients atteints de MA (Mansuroglu et al., 2016; Chatterjee et al., 2018). En plus du maintien de l'intégrité génomique, Tau peut participer à la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la fonction neuronale (Benhelli-Mokrani et al., 2018).

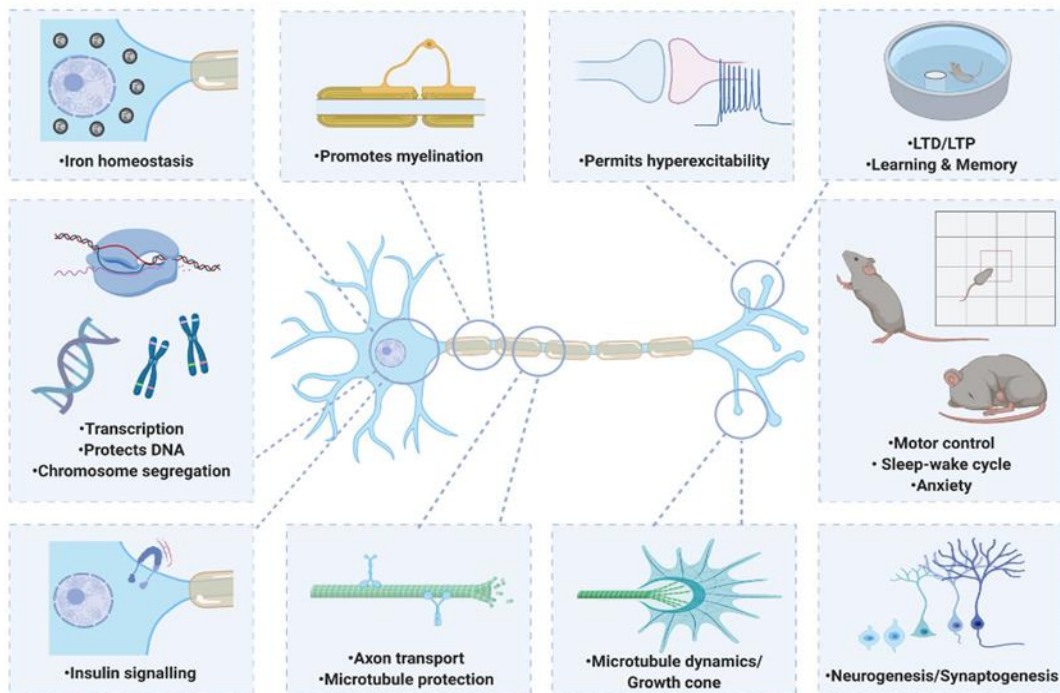


Figure 14 : Principales fonctions physiologiques de la protéine Tau.

Tau joue un rôle dans la dynamique microtubulaire, le transport axonal et mitochondrial. Tau participe à la neurogenèse, à la synaptogenèse ainsi qu'à l'apprentissage et à la mémoire. Tau intervient aussi dans le contrôle moteur, le rythme circadien et l'anxiété. Tau serait également impliquée dans l'homéostasie du fer (Kent et al., 2020).

3.4 Modifications post-traductionnelles de Tau (MPT)

La protéine Tau subit de nombreuses MPT telles que la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, la méthylation, la nitration, l'ubiquitinylation, la sumoylation, la polyisomérisation ou encore la troncation (Martin et al., 2011)(figure 15).

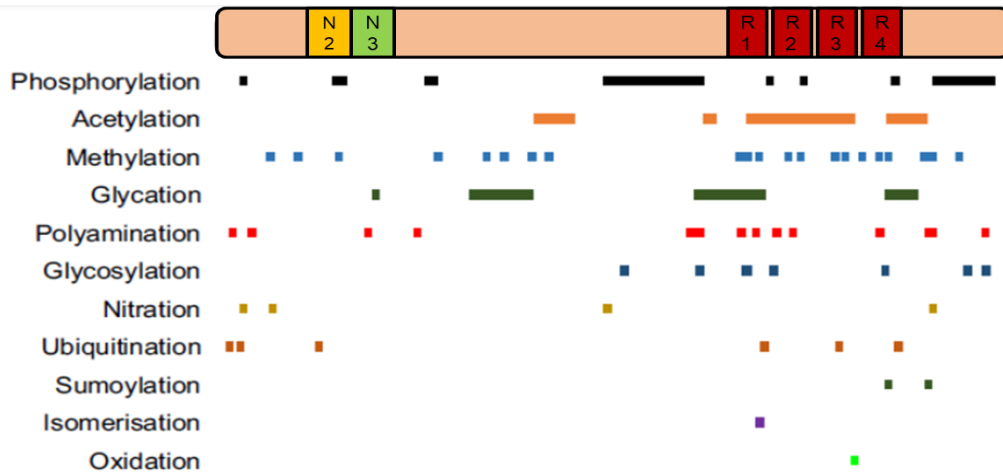


Figure 15 : Schématisation des sites de modifications post-traductionnelles de la protéine Tau.

Les sites de modifications post-traductionnelles sont représentés approximativement par des barres colorées sur l'isoforme 2N4R de Tau. Modifié de Guo et al., 2017.

La MPT la plus étudiée est la phosphorylation compte tenu des 85 sites potentiels de phosphorylation (45 résidus sérine, 35 thréonine et 5 tyrosine) sur les 441 acides aminés qui composent la plus longue isoforme exprimée dans le cerveau (758 acides aminés dans les tissus périphériques) (figure 16). La phosphorylation consiste en l'ajout covalent d'un résidu phosphate provenant de l'ATP (adénosine triphosphate) sur un groupement hydroxyle d'une chaîne latérale de résidus sérine, thréonine ou tyrosine. La plupart de ces sites se trouvent dans les domaines de répétitions et les domaines adjacents caractérisés par « domaine d'assemblage des microtubules » (Sergeant et al., 2008; Wesseling et al., 2020; Wegmann et al., 2021). Tau est ainsi phosphorylée par des protéines kinases dirigées par des prolines (*proline directed kinase*) telles que la *Glycogen synthase kinase-3β* GSK3β (Llorens-Martin et al., 2014) ou encore la *cyclin-dependent like kinase-5* CDK5 (Kimura et al., 2014) et la *dual specificity tyrosin phosphorylation regulate kinase 1A* DYRK1A (Woods et al., 2001).

D'autres kinases sont capables de phosphoryler Tau comme la *calcium/calmoduline-activated protein* CaMKII, *protein kinase A* PKA et la *casein kinase 1* CK1 (Morishima-Kawashima et al., 1995). Tau peut aussi être déphosphorylée par des phosphatases en conditions physiologiques dont la principale est la *phospho protein phosphatase* PP2A (Bennecib et al., 2000). Ces MPT, et notamment des niveaux élevés de phosphorylation en conditions pathologiques peuvent agir sur

sa solubilité et moduler ses fonctions. De plus, il semble que ces modifications telles que l'hyperphosphorylation puissent conduire à la production d'espèces de Tau oligomérisées et/ou agrégées (Cieplak, 2019). La phosphorylation de certains de ces sites potentiels de phosphorylation comme la Ser262 et la Ser396 diminuent fortement les interactions entre Tau et les microtubules (Mandelkow and Mandelkow, 1995; Delacourte and Buée, 1997) ou d'autres comme les Ser202/Thr205/Ser208 promeuvent son agrégation. Ainsi, la Tau hyperphosphorylée ou encore anormalement phosphorylée sur certains sites comme la Ser422 se détache des microtubules, s'agrège dans les neurones pour former les dégénérescences neurofibrillaires, lesquelles conduisent à la mort neuronale (Despres et al., 2017). D'autres formes de Tau (monomères, dimères, trimères et oligomères) peuvent aussi jouer un rôle dans le développement de la MA (Cowan and Mudher, 2013). L'apparition des symptômes cliniques corrèle avec l'élévation du niveau d'oligomères de Tau (Lasagna-Reeves et al., 2012). Il est montré que des injections intracérébrales de formes oligomériques de Tau plutôt que des monomères ou des fibrilles dans des souris sauvages induisent des altérations de la cognition, la synapse ou encore la mitochondrie (Lasagna-Reeves et al., 2011).

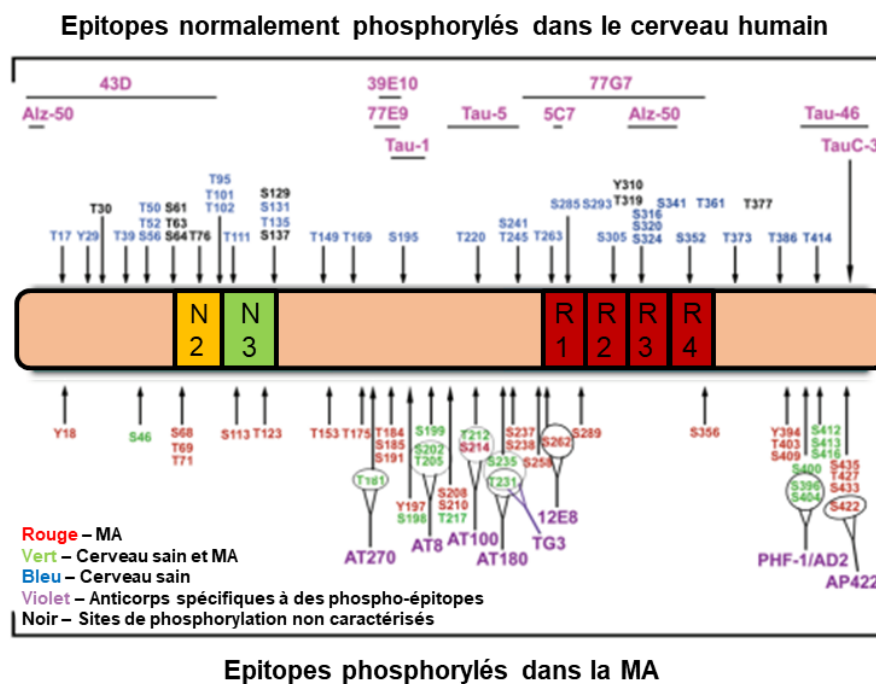


Figure 16 : Représentation des sites de phosphorylation potentielle de Tau et de leurs épitotes reconnus par des anticorps spécifiques.

Sont représentés (en rouge) les sites phosphorylés uniquement en condition pathologique, (en bleu) les sites phosphorylés dans les conditions physiologiques, (en vert) les sites de phosphorylation normale et pathologique, (en noir) des sites de phosphorylation pas entièrement caractérisés, (en violet) des anticorps spécifiques aux phospho-épitopes correspondants et (en rose) des anticorps spécifiques à des épitopes non phosphorylés. Modifié de Šimić et al., 2016.

3.5 Processus d'agrégation de Tau

L'investigation ultrastructurale de Tau a montré que les dégénérescences neurofibrillaires étaient faites de structures en double hélice avec une périodicité d'environ 80nm appelés *Paired helical filaments* PHF (Brion et al., 1985; Miller et al., 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986). De plus, l'hyperphosphorylation de Tau est identifiée comme étant une signature moléculaire de la dégénérescence neurofibrillaire. En effet, on observe un état de phosphorylation de Tau trois fois plus élevé en condition pathologique, avec environ 45 sites phosphorylés contre 10 sites de phosphorylation détectés sur la Tau purifiée à partir de cerveau d'individu sain (Hanger et al., 1991, 2007). Cette augmentation du niveau de phosphorylation conduit à l'accumulation et l'agrégation de protéines Tau de conformation « anormale » (Köpke et al., 1993). Même si plusieurs sites de phosphorylation de Tau sont retrouvés phosphorylés au niveaux des PHF, l'hyperphosphorylation semble précéder son état d'agrégation (Hasegawa et al., 1996; Buée et al., 2000; Šimić et al., 2016). Néanmoins, jusqu'à présent, on ne sait pas si les MPT de la protéine Tau insoluble provenant de cerveaux atteints de la MA se produisent avant ou après la formation

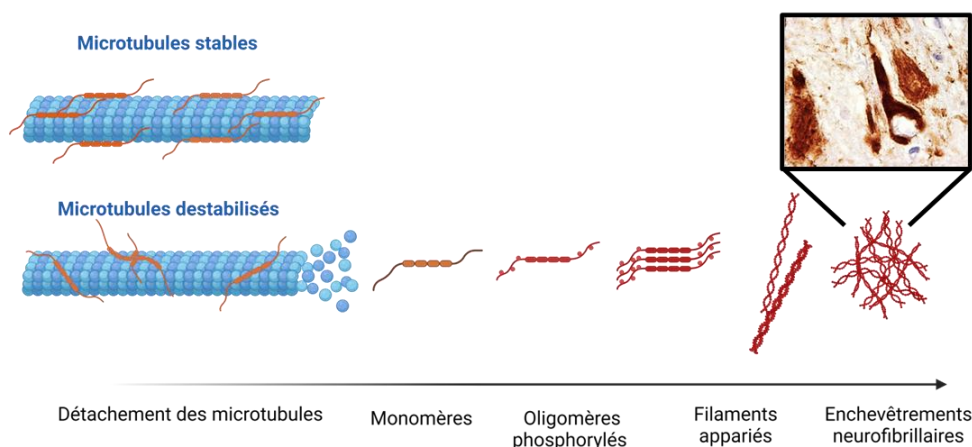


Figure 17 : Processus de formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF).

Les monomères de Tau suite à la modification des niveaux de phosphorylation peuvent s'assembler en oligomères, en filament appariés droits ou en hélice pour ensuite conduire à la formation des DNF au niveau des neurones. Ces formes d'assemblage de Tau sont capables de recruter la Tau non pathologique et contribuer à la propagation des DNF.

d'agrégats insolubles. Alors que les résidus du domaine de répétitions sont enfouis dans le noyau des agrégats de Tau fibrillaires et sont donc probablement inaccessibles à la modification après l'agrégation, les parties N- et C-terminales non structurées de Tau dépassent du noyau des fibrilles et restent donc en principe accessibles à l'ajout ou au retrait de MPT après la fibrillation (Wegmann et al., 2021). Des études montrent que la Tau propice à former des agrégats provenant de stades ultérieurs de la maladie, qu'il s'agisse de Tau soluble oligomérique ou de Tau agrégée,

présente un degré de phosphorylation plus élevé et est acétylée et ubiquitinée dans le domaine d'association aux microtubules de Tau (Wesseling et al., 2020).

L'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau conduisent à une perte de ses fonctions physiologiques et à un gain de fonction toxique. En effet, Tau phosphorylée perd sa capacité à stabiliser les microtubules, conduisant à leur dépolymérisation (Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993). Tau s'accumule donc dans le cytoplasme et s'organise en structures ordonnées qui lui confèrent une conformation pathologique différente pour former des oligomères puis des structures filamenteuses insolubles et ensuite les enchevêtrements neurofibrillaires (**figure 17**) (Cieplak, 2019). Le transport axonal se voit aussi altéré et Tau est relocalisée du compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique causant un dysfonctionnement synaptique et conduisant à la dégénérescence (Tashiro et al., 1997; Roy et al., 2005; Zempel et al., 2010).

La détection des PHF est un enjeu majeur dans l'étude de la MA, aussi bien en diagnostic qu'en traitement ou en étude préclinique. Depuis la première détection de la protéine Tau agrégée par l'équipe de Brion (Brion et al., 1985), différents anticorps ont été mis au point. L'anticorps AT8 est l'un des plus utilisés en ciblant les phosphorylations sur la Ser202 et Thr205 qui sont caractéristiques des pré-enchevêtrements neurofibrillaires (*pre-tangles*) (Bancher et al., 1989). L'anticorps anti-conformationnel MC1 a été mis au point quelques années plus tard, celui-ci permet de détecter les PHF de Tau en se fixant sur 2 portions discontinues en Cter et Nter de protéines Tau agrégées (Jicha et al., 1997). L'anticorps AT100 est également communément utilisé pour marquer les enchevêtrements neurofibrillaires en ciblant les Thr212 et Ser214, qui sont phosphorylées uniquement dans ces conditions. D'autres anticorps ciblent des phospho-épitopes spécifiques (Ser262, Ser396, Ser404, Ser422) caractéristiques retrouvés anormalement ou hyperphosphorylés dans les conditions pathologiques (Buée-Scherrer et al., 1996; Seubert et al., 1995; Bussière et al., 1999).

3.6 *Sécrétion de Tau*

Un nombre croissant d'études montre que la protéine Tau notamment sous sa forme pathologique peut se propager de cellule en cellule suivant une voie de sécrétion et d'internalisation la rendant capable de recruter la Tau physiologique « normale » et induire son mauvais repliement et son assemblage. Ainsi la pathologie Tau peut se propager à des régions connectées à travers les synapses (Clavaguera et al., 2009; Calafate et al., 2015).

Les études sur la sécrétion de Tau ont révélé plusieurs mécanismes. La protéine Tau semblerait être sécrétée par trois voies potentielles : la translocation à travers la membrane plasmique ou par des organelles et/ou la sécrétion par des ectosomes (Merezhko et al., 2020).

Ainsi, Tau peut être libérée dans l'espace extracellulaire d'un neurone receveur sous forme libre (Borchelt et al., 1996; Pooler et al., 2013; Katsinelos et al., 2018) ou sous forme vésiculaire (ectosomes ou exosomes) (Dujardin et al., 2014, 2018). La sécrétion de Tau peut aussi se faire par l'intermédiaire de nanotubes (Tardivel et al., 2016) ou encore par transport par les cellules gliales (partie 5.4).

3.7 Dépôts de Tau

L'accumulation de Tau dans la MA est observée au niveau des neurones. Cette accumulation se fait au niveau du corps cellulaire pour former les DNF mais aussi dans les extrémités axonales qui entourent sous forme de couronne les dépôts amyloïdes. L'accumulation de Tau dans les dendrites peut aussi être observée ce qu'on appelle filaments du neuropile ou fibres tortueuses. Les pré-enchevêtrements neurofibrillaires (**figure 18a**) caractérisent les fortes concentrations en Tau dans le corps cellulaire sans agrégation visible.

- **DNF** : Les dégénérescences neurofibrillaires (**figure 18b**) sont principalement retrouvées dans la couche pyramidale de l'hippocampe, du cortex entorhinal et des couches III et V de l'isocortex. Ces lésions sont faites de protéines Tau dans une configuration en feuillet β qui forme des filaments hélicoïdaux appariés, structure souvent marquée par des anticorps conformationnels tel que MC1 par exemple dans l'état de pré-enchevêtrement neurofibrillaire (**figure 18a**) (Jicha et al., 1997).
- **Filaments du neuropile** : Protéine Tau organisée en filaments hélicoïdaux appariés qui s'accumulent dans les dendrites (**figure 18c**) des neurones en dégénérescence ou au niveau des plaques neuritiques (Braak et al., 1986, 1994).
- **Couronne neuritique** : Fragments immunoréactifs pour Tau. Les neurites dystrophiques contiennent d'autres protéines du fait qu'ils restent connectés à des corps cellulaires viables (**figure 18d**).

L'analyse prospective de groupes de sujets âgés a permis d'établir des corrélations entre la densité des lésions neurologiques et la détérioration intellectuelle. En effet, la pathologie neurofibrillaire qu'il s'agisse de la densité des DNF ou des plaques neuritiques corrèle avec cette détérioration (Dickson et al., 1995).

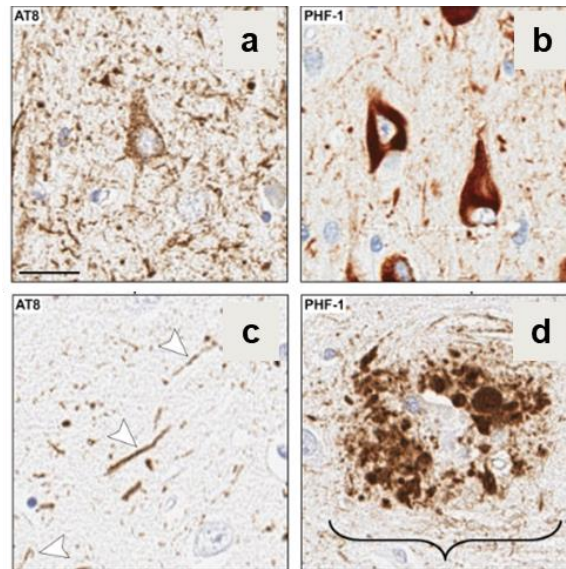


Figure 18 : Les dépôts intraneuronaux de la protéine Tau.

La Tau anormale est localisée au niveau (1) du corps cellulaire pour former les enchevêtrements matures (b) qui prennent la forme du neurone précédés par une forme de pré-enchevêtrement neurofibrillaire (a) où l'accumulation de Tau est périnucléaire et diffuse, (2) dans les terminaisons dendritiques (filaments du neuropile (c)) et dans les neurites dystrophiques en dehors du soma pour former des plaques neuritiques (d). Un anticorps AT8 a été utilisé pour marquer les pré-enchevêtrements neurofibrillaires et les filaments du neuropile ; PHF-1 a été utilisé pour les enchevêtrements neurofibrillaires matures et la plaque neuritique. (Moloney et al., 2020)

3.8 L'hypothèse de la propagation type prion

Une question importante par rapport à la progression anatomique de la maladie est si celle-ci est initiée par la pathologie dans le cortex entorhinal ou si le dysfonctionnement pathologique dans les zones de l'hippocampe se développe indépendamment. De la même façon que pour les dépôts amyloïdes, les dégénérescences neurofibrillaires mais aussi les dépôts d' α -synucléine dans la maladie de Parkinson et la démence à corps de Lewy sembleraient suivre une propagation stéréotypée par un mécanisme de type prion. En effet, l'injection de lysats de patients atteints de MA ou des agrégats d'A β au niveau cérébral de rongeurs exprimant le peptide amyloïde humain a permis l'induction de dépôts amyloïdes (Kane et al., 2000; Meyer-Luehmann et al., 2006).

Des expériences similaires ont été conduites en injectant des lysats de patients MA ou des extraits de Tau humaine dans des cerveaux de rongeurs pour montrer que Tau suit les mêmes mécanismes de propagation (Clavaguera et al., 2009, 2013).

D'autres études ont été réalisées pour montrer au-delà des mécanismes de propagation stéréotypée de Tau et A β , que ce dernier serait capable d'induire la propagation de Tau en dehors du cortex entorhinal comme observé durant la MA dans des modèles de souris exprimant la Tau humaine (Vasconcelos et al., 2016). De telles études fournissent la preuve d'une induction de propagation de la pathologie Tau par A β et permettraient de dépasser la dissociation spatiale entre les deux protéinopathies (Les interactions Tau/A β sont traitées dans dans le chapitre 4).

La manière dont Tau est sécrétée puis intégrée par les neurones récepteurs est devenue un élément important pour comprendre la propagation de la pathologie Tau. En ce qui concerne la propagation des prions, il a été démontré qu'elle se fait non seulement le long de voies neuro-anatomiques, mais aussi indépendamment de la voie anatomique ou de l'emplacement physique du site d'inoculation du prion (Collinge, 2016).

L'hypothèse « prion-like » gagne en terrain et en crédibilité, les mécanismes de propagation de la protéine Tau sont désormais mis au centre du processus de la neuropathologie.

3.9 Effets de la réduction de Tau

Tau est impliquée dans plusieurs autres troubles cérébraux dans lesquels la perturbation des réseaux neuronaux n'est pas associée à une pathologie visible de Tau ou à son agrégation. C'est le cas pour l'autisme, la dépression et les accidents vasculaires cérébraux (Tai et al., 2020; Chang et al., 2021b). Certaines études ont montré qu'une réduction de la protéine Tau prévient l'hypersynchronie du réseau neuronal et peut supprimer l'épileptogénèse en modulant de manière différentielle les fonctions des neurones excitateurs (Chang et al., 2021). Aussi, il a été montré que la réduction génétique de Tau dans des modèles murins de MA peut prévenir l'activité épileptiforme non convulsive (Li et al., 2014).

La réduction de la protéine Tau est par conséquent considérée comme agent thérapeutique potentiel dans le traitement de la MA. En effet, plusieurs études ont montré que la réduction complète ou partielle de la protéine Tau permettait de prévenir les troubles de l'apprentissage et de la mémoire chez la souris ainsi que d'autres déficits liés à la MA dans plusieurs modèles murins de la MA. DeVos et collaborateurs ont montré que la réduction de Tau dans le modèle P301S prévient la pathologie Tau, la perte de volume de l'hippocampe et la mort neuronale (DeVos et al., 2017). Ils ont aussi montré que la réduction de Tau dans un modèle inductible pour Tau en présence et en absence d'amyloïde permettait dans les deux cas de figures de diminuer la pathologie Tau et la perte neuronale qui en découle (DeVos et al., 2018a). Leroy et collaborateurs avaient précédemment démontré un effet protecteur de la réduction de Tau contre l'excitotoxicité de l'amyloïde dans le modèle APP/PS1 (Leroy et al., 2012).

4 Perte synaptique et neuronale

Comme mentionné précédemment, cette accumulation de protéines Tau au niveau des neurones amène ces derniers à dégénérer et provoque ainsi la mort neuronale (**figure 19e**). La perte neuronale a aussi été reliée à l'accumulation intraneuronale d'A β dans des modèles murins de MA (Wirhth and Bayer, 2012). Par conséquent, une perte neuronale est observée au niveau de la couche II du cortex entorhinal où elle peut atteindre 90% de la population neuronale à des stades avancés de la MA (Gómez-Isla et al., 1996). Une perte neuronale est également observée au niveau de la CA1 et du gyrus denté de l'hippocampe (Braak et al., 1986; West et al., 1994; Grignon et al., 1998). La perte neuronale a été étudiée dans plusieurs structures du cerveau notamment en termes de nombre de neurones chez des sujets atteints de MA par rapport au vieillissement normal (Duyckaerts et al., 2009).

La période d'incubation silencieuse de la MA, bien avant l'installation des lésions et la détection des troubles cognitifs, est caractérisée par des anomalies de fonctionnement synaptique et du réseau neuronal induits par l'A β oligomérique (Shankar et al., 2008). En effet, on observe une altération de la libération/capture des neurotransmetteurs, des modifications de la localisation cellulaire des récepteurs, des anomalies du cytosquelette et une perturbation de la plasticité synaptique, effets qui seraient à l'origine de déficits mnésiques par la suite. Le peptide A β mais également la protéine Tau hyperphosphorylée auraient des effets cytotoxiques directs et indirects sur la neurotransmission, le transport axonal ainsi que la réponse immunitaire ce qui provoque une perte synaptique et des dysfonctionnements dans la libération des neurotransmetteurs (Rajmohan and Reddy, 2017).

Les études sur biopsies de patients atteints de la MA montrent des changements au niveau des terminaisons pré et post-synaptiques mais aussi au niveau des axones et dendrites que ce soit au niveau des plaques séniles ou autour (Gonatas et al., 1967). Il a aussi été montré, toujours par des études ultrastructurales de biopsies de patients, que le nombre de synapses est significativement diminué comparé à des sujets contrôles. Cette perte synaptique corrèle souvent avec les scores au MMSE (DeKosky and Scheff, 1990) et donc avec la perte cognitive chez les patients. Il semblerait que la perte synaptique chez les patients précède la neurodégénérescence (DeVos et al., 2018b; Lleó et al., 2019). L'altération synaptique constitue un point d'intersection entre A β , Tau et les troubles cognitifs (Spires-Jones and Hyman, 2014). Les plaques amyloïdes sont souvent entourées d'oligomères solubles et d'un contenu synaptique altéré et marqué par une baisse de marqueurs présynaptiques et postsynaptiques (Spires et al., 2005). Les altérations synaptiques peuvent très bien entraîner des conséquences sur l'intégrité des circuits neuronaux et agir à distance sur d'autres parties du cerveau ce qui pourrait expliquer le caractère topographique de la maladie.

Comme discuté dans la partie « sécrétion de Tau », il est suggéré que la protéine Tau puisse passer d'un neurone à un autre, ce transfert peut impliquer la synapse c'est-à-dire que Tau se propage à travers la synapse pour aller créer des dépôts dans les neurones en aval (Liu et al., 2012). La protéine liée au récepteur des lipoprotéines de faible densité 1 (LRP1) contrôle l'endocytose de Tau et notamment les espèces nucléantes de Tau peuvent être internalisées par LRP1 au niveau de la synapse (Rauch et al., 2020).

Dans le cerveau sain, le remodelage synaptique est un processus présent. Les synapses sont marquées pour être éliminées par la microglie. Celle-ci peut aussi éliminer les synapses au niveau des dendrites saines. Il a été démontré que le dysfonctionnement de l'élimination synaptique par la microglie qui est médié entre autres par des protéines du complément et par ApoE est impliqué dans la neuropathologie précoce. La réponse inflammatoire peut être protectrice dans les premiers stades de la MA (**figure 19b**) mais peut basculer par la suite en une inflammation chronique dysfonctionnelle suite à l'activation continue des cellules gliales et l'altération des mécanismes d'élimination, ce qui pourrait aggraver la pathologie (**figure 19c**) (Karch and Goate, 2015).

5 Réactivité gliale

Les cellules gliales sont des cellules qui jouent un rôle de support, de protection et de maintien des neurones (**figure 19a**). Il en existe 3 types dans le système nerveux central mature : la microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes.

Dans le cas de la MA, la neuroinflammation est considérée comme étant la troisième composante (Kinney et al., 2018) du fait que l'accumulation d'A β et de Tau hyperphosphorylée peut induire une réponse inflammatoire irréversible. Il est vrai que la MA est une maladie essentiellement neurodégénérative mais les astrocytes ainsi que la microglie jouent aussi un rôle important dans le développement de la maladie. Ces cellules inflammatoires ainsi qu'un nombre de cytokines, chémokines et les molécules du complément sont retrouvés à des niveaux augmentés dans la MA (McGeer, 2001).

Depuis le début des années 1990, des études ont montré que la microglie activée, les composants de la cascade du complément, les cytokines pro-inflammatoires sont impliqués dans un processus inflammatoire autour de la plaque sénile (Dickson et al., 1993). Le facteur du complément C1q joue aussi un rôle important dans le regroupement de la microglie et la sécrétion des cytokines au niveau des plaques séniles (Veerhuis et al., 2003). D'autres molécules pro-inflammatoires sont aussi associées à la progression de la maladie et des troubles cognitifs comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) (Tarkowski, 2003).

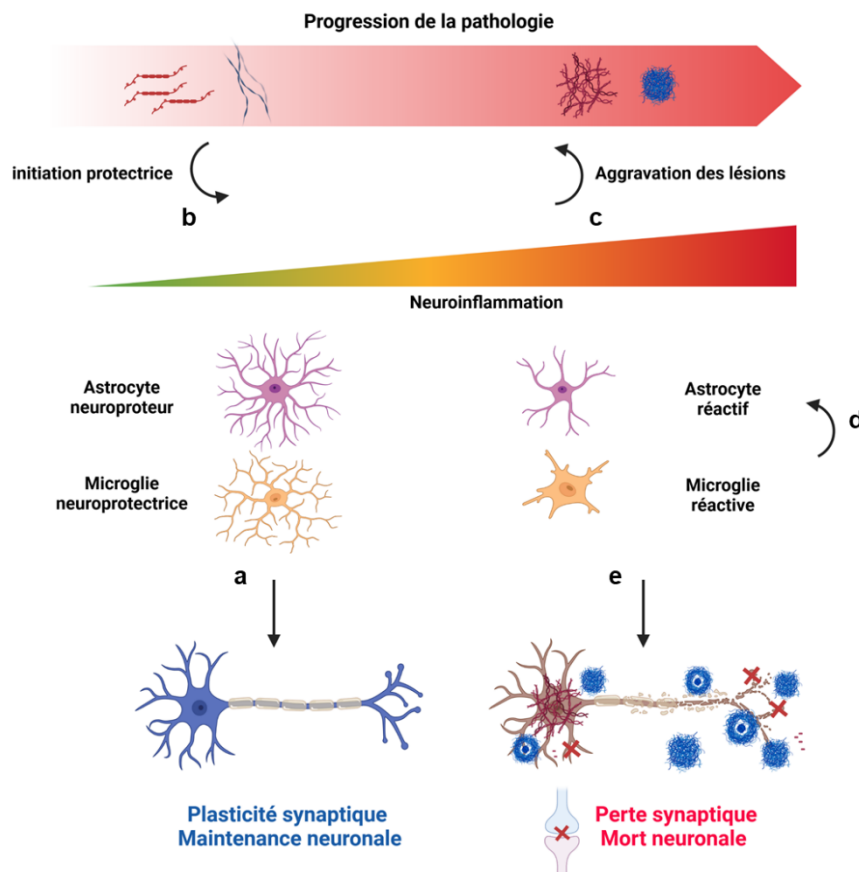


Figure 19 : Réactivité gliale dans le contexte pathologique.

(a) Les cellules gliales contribuent au maintien de l'homéostasie cérébrale. (b) Au niveau pathologique, l'accumulation d'oligomères d'A β et Tau induit une réponse inflammatoire. (c) L'état de la neuroinflammation va augmenter avec l'accumulation d'A β et Tau dans le cerveau et (d) entraîner une réactivité astrocytaire qui va devenir délétère et (e) causer des dommages synaptiques et conduire à la mort neuronale (Selkoe and Hardy, 2016).

L'activation continue de la microglie et des astrocytes pourrait, par son effet aggravateur sur la pathologie amyloïde et Tau, servir de lien dans la pathogenèse de la maladie (**figure 19e**) (Kinney et al., 2018). Les altérations inflammatoires discutées peuvent jouer un rôle dans la prédisposition à la MA. D'ailleurs, certaines mutations sur des gènes liés à l'inflammation sont considérées

comme facteurs de risque pour la MA comme : ApoE, TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), CD33 (*sialic acid binding Ig-like lectin 3*), CLU, Bin1 (*Bridging Integrator 1*).

5.1 Astrocytes

Les astrocytes sont des cellules complexes qui jouent des rôles divers dans le support et le maintien des neurones, notamment un rôle dans le maintien de l'homéostasie électrolytique et lipidique, le recyclage des neurotransmetteurs ainsi que la modulation de l'activité synaptique (Oksanen et al., 2019).

Les astrocytes, dont le rôle est de maintenir l'homéostasie du système nerveux central subissent des changements morphologiques dramatiques et sont retrouvés réactifs à proximité des lésions chez les patients atteints de MA (Wilhelmsson et al., 2006; Simpson et al., 2010). Cette réactivité corrèle avec la densité des lésions (**figure 19**) (Cairns et al., 1992) et est responsable de l'activation de nombreux gènes au niveau des populations astrocytaires (Zamanian et al., 2012). Cette activation suscite un débat sur son rôle bénéfique ou aggravateur.

Dans les conditions pathologiques, la libération d'interleukine 1 alpha (IL-1 α) par la microglie activée et TNF α favorise une réactivité neurotoxique des astrocytes. Le terme « astrocyte réactif » est apparu durant les années 1970 avec la découverte de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), protéine majeure faisant partie des filaments intermédiaires de type III et localisée dans les astrocytes. La GFAP reste actuellement le marqueur d'astrocytes réactifs le plus utilisé (Escartin et al., 2021), son expression étant augmentée lors du processus d'activation. Sur le plan morphologique, les astrocytes activés sont notamment caractérisés par une hypertrophie. Les astrocytes interviennent aussi au niveau de la transmission synaptique de Tau (Narasimhan et al., 2017; Perea et al., 2019) et se sont avérés capables de transmettre la protéine Tau internalisée aux neurones (Goetzl et al., 2016).

Dans le cerveau de patients atteints de MA, les plaques amyloïdes sont entourées d'astrocytes réactifs qui voient leurs sécrétomes modifiés. Les protéines exprimées de manière différentielle semblent être impliquées dans le recrutement, la clairance d'A β et la régulation de la neurogenèse (Lai et al., 2013). Le contact observé entre les astrocytes et les plaques amyloïdes est nécessaire pour limiter le développement des plaques mais aussi atténuer les neurites dystrophiques associés ce qui montre un rôle protecteur de l'activation astrocytaire (Kraft et al., 2013).

Les astrocytes peuvent aussi contribuer aux dommages synaptiques observés dans la MA en libérant des quantités excessives de glutamate suite à la stimulation des récepteurs nicotiques $\alpha 7$ par A $\beta 42$ (Pirttimaki et al., 2013).

5.2 Microglies

Les cellules microgliales sont les cellules résidentes du système immunitaire du cerveau. Ce sont les macrophages du tissu cérébral qui contribuent donc à la réponse immunitaire aux blessures et aux infections ainsi qu'à la clairance des microbes, des cellules mortes, des synapses et des agrégats protéiques (Colonna and Butovsky, 2017). Ces cellules sont reconnues par l'expression de certains marqueurs comme CD11b (*integrin alphaM subunit*), Iba1 (*ionized calcium binding adapter molecule*) ou TREM2.

Dans les conditions physiologiques, la surveillance de l'homéostasie du cerveau est assurée par la microglie. Dans son état de repos, elle est ramifiée pour communiquer avec les neurones et surveiller leur environnement au moyen de plusieurs récepteurs de neurotransmetteurs comme les récepteurs au glutamate et au GABA ou encore à l'acétylcholine (Liu et al., 2016) et les récepteurs pour plusieurs cytokines et chémokines comme CCL2 (*chemokine ligand 2*), Interleukine-1 β , -6, -8, -10, -12, 15, IP-10 (*interferon gamma inducible protein-10*) et TNF α (Lee et al., 2002).

Lors de lésions, les cellules microgliales vont détecter le changement d'environnement via leurs récepteurs de cytokines ainsi que des récepteurs de reconnaissance de motifs variés PRR (*pattern recognition receptors*) (Colton and Wilcock, 2010). L'arborisation de la microglie est réduite suite à son activation avec des extrémités réduites et un corps cellulaire hypertrophié.

La microglie est capable d'éliminer la protéine Tau extracellulaire par phagocytose dans les conditions physiologiques. Cependant, quand le système de clairance arrive à défaillance suite à une neuroinflammation chronique, la microglie peut participer à la propagation de Tau pathologique par sécrétion en utilisant des exosomes (Asai et al., 2015; Hopp et al., 2018; Vogels et al., 2019). La protéine Tau permet l'activation pro-inflammatoire de la microglie par activation de la voie p38 MAPK (Perea et al., 2018). D'une façon similaire aux astrocytes, la microglie contribue aussi à l'internalisation des plaques amyloïdes grâce au récepteur TREM2 dont la perte de fonction a été corrélée à un risque accru de développer la MA (Jin et al., 2015; Zhao et al., 2018). Suite à l'activation chronique, l'efficacité de la microglie à phagocyter l'A β est diminuée ce qui réduit sa capacité à éliminer les plaques amyloïdes. On retrouve donc une microglie réactive qui a subi des modifications morphologiques et géniques autour des plaques amyloïdes (Cipriani et al., 2011).

5.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes, quant à eux, produisent la gaine de myéline et ont donc un rôle d'isolation et de soutien métabolique des axones (Simons and Nave, 2016). Ils présentent aussi des transcriptomes altérés et hétérogènes dans la MA (Sadick et al., 2022).

5.4 Contribution des médiateurs de l'inflammation

Comme mentionné précédemment, les plaques amyloïdes ainsi que l'A β soluble provoquent une activation de la microglie ainsi que la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 β (IL-1 β) et TNF α ainsi que des espèces réactives à l'oxygène et au nitrogène (Prinz et al., 2019). Il a aussi été démontré que la déplétion de la microglie supprime la propagation de la protéine Tau dans un modèle de propagation rapide (Asai et al., 2015). Cette même étude montre que la microglie contribue à la propagation de Tau à travers la voie exosomale. D'autre part, des études ont montré que la microglie était capable d'internaliser Tau soluble et insoluble *in vitro* et *in vivo*. Cette internalisation est aussi susceptible de provoquer l'activation de la microglie.

De la même façon que la microglie, les astrocytes peuvent être situés au niveau des synapses et sont capables de capturer et dégrader la Tau extracellulaire, ils peuvent ainsi inhiber ou du moins ralentir la propagation de Tau à travers les synapses. L'augmentation de l'expression et de l'activité du facteur de transcription TFEB, un régulateur principal de la biogenèse lysosomale en réponse à la pathologie Tau, a été montrée. Une expression induite de TFEB dans les astrocytes a réduit la pathologie Tau dans l'hippocampe de souris PS19 (P301S) (Martini-Stoica et al., 2018). Ces données suggèrent que TFEB astrocytaire joue un rôle fonctionnel dans la régulation de la propagation de Tau.

5.5 Intérêt thérapeutique

L'une des stratégies les plus prometteuses actuellement consiste à contrôler la réactivité cérébrale vis-à-vis des lésions, grâce à des molécules capables de restaurer les fonctions physiologiques des cellules gliales et contrôler le processus de neuroinflammation. Ces molécules offriraient de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ainsi, bloquer l'expression génétique des cytokines ou la libération/liaison à leurs récepteurs sont aussi des stratégies envisageables pour réduire la pathogenèse tout comme neutraliser IL-1 β , le récepteur TNF- α par des anticorps ou encore inhiber C1q. Plus d'études expérimentales pour étudier les voies du processus neuroinflammatoire et définir le meilleur moment pour le contrôler doivent encore être réalisées. Il sera ainsi possible d'élaborer des stratégies thérapeutiques plus ciblées et plus efficaces pour ralentir la progression de la MA. (von Bernhardi et al., 2015; Bronzuoli et al., 2016).

Partie 3 : Modélisation de la maladie d'Alzheimer

1 Etiologie

Il existe deux formes de la MA : une forme sporadique majoritaire dont le principal facteur de risque est l'âge, et une forme familiale minoritaire (<5% des cas) caractérisée par des mutations dans 3 gènes impliqués dans la production d'A β (Reitz and Mayeux, 2014).

1.1 Facteurs génétiques et formes familiales

Les formes familiales de la MA sont liées à des mutations sur le gène APP (**figure 20**) ou sur les présénilines 1 et 2, qui font partie du complexe γ -secrétase. Ces mutations sont responsables d'une accumulation anormale de peptide amyloïde A β et leur présence conduit au développement d'une forme familiale de la maladie de façon précoce (65 ans). Une centaine de mutations dominantes ont été découvertes sur le gène PS1. Ces mutations sont responsables de 80% des formes familiales et conduisent à une forme agressive et précoce de la maladie (Duering et al., 2005). Contrairement à PS1, les mutations dans le gène PS2 sont rares et associées à une forme familiale moins agressive (Sherrington et al., 1995). Concernant le gène APP, la mutation la plus notable sur la séquence A β qui augmente la production de ce dernier est la mutation KM670/671NL (mutation suédoise). D'autres mutations d'APP, associées à la MA d'origine

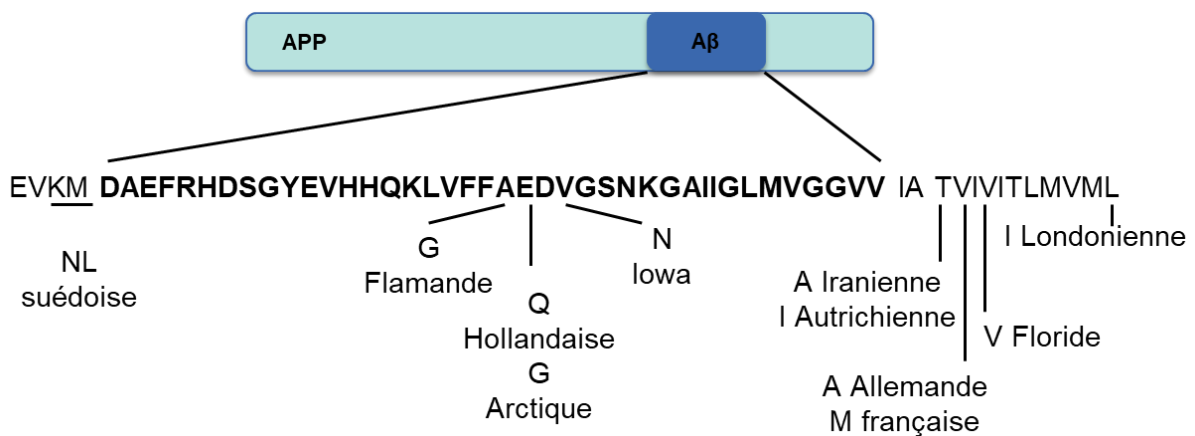


Figure 20 : Mutations identifiées sur le gène APP.

Mutations qui sont responsables de formes familiales de la MA sont représentées sur la séquence de l'APP. génétique incluant la mutation E693G (Arctique) et I716F (Ibérienne) entraînent une surproduction d'A β ou un changement du rapport A β ₄₂/A β ₄₀ vers la formation du peptide A β ₄₂ pro-agrégatif (St George-Hyslop, 2000). Les mutations au niveau des présénilines peuvent, quant à elles, modifier le site de clivage de la γ -secrétase de manière à augmenter la production d'A β hautement fibrillogène.

1.2 Formes sporadiques

Les formes sporadiques de la maladie sont les plus fréquentes. Bien que ces formes soient en premier lieu liées à l'âge, elles ont plutôt une origine multifactorielle complexe, combinant à la fois des facteurs de risque génétiques et environnementaux (Reitz and Mayeux, 2014).

Le facteur de risque génétique le plus important est le gène de l'ApoE qui est une protéine essentiellement produite par les astrocytes et qui joue un rôle dans le transport des lipides, le métabolisme du glucose, la signalisation neuronale ainsi que la neuroinflammation et la fonction mitochondriale. ApoE existe sous 3 isoformes et le fait d'être homozygote pour ApoE 4 augmente de huit fois le risque de développer la MA en diminuant l'âge de sa survenue. Les porteurs asymptomatiques de cet allèle constituent une tranche représentative de la phase silencieuse et asymptomatique de la MA. A l'inverse, ApoE 2 qui est l'allèle le moins commun (environ 8%) semble avoir un rôle protecteur (Li et al., 2020). Différentes voies d'association entre ApoE et le risque de développer la MA ont été définies *in vitro* et *in vivo* mais les mécanismes exacts ne sont toujours pas complètement élucidés. Les propositions restent toujours controversées même si les effets des isoformes de ApoE sur l'amyloïde ont déjà été confirmés chez l'homme ainsi que dans des modèles cellulaires et animaux (Serrano-Pozo et al., 2021). L'effet délétère d'APOE4 a été relié au développement de la pathologie via A β avec des effets notamment sur la plasticité synaptique ainsi que sur la réparation neuronale et les fonctions cérébrovasculaires (Yamazaki et al., 2019).

De récentes études d'association pangénomique (*genome-wide association study* GWAS) ont réussi à cribler des milliers de cas de MA qui ont conduit à l'identification d'environ 200 facteurs de risques génétiques potentiels en rapport avec 40 *loci* associés à la maladie (Lambert et al., 2013; Bellenguez, 2022). De plus, des données de séquençage d'exons ont pu identifier des variants rares à risque élevé de développer la MA (Holstege et al., 2022). Une grande partie de ces facteurs génétiques est liée à l'agrégation de l'amyloïde- β , le métabolisme des lipides et la fonction microgliale (**figure 21**).

En plus de l'âge qui constitue le principal facteur de risque, d'autres facteurs de risque de la maladie ont été identifiés tels que le sexe avec une prévalence accrue chez les femmes à partir de 70 ans (Women's Brain Project and the Alzheimer Precision Medicine Initiative 2018), ou encore des facteurs pathologiques comme le cas des accidents vasculaires cérébraux AVC ou d'insuffisance cardiaque (de Bruijn and Ikram, 2014) mais aussi le diabète. Les facteurs environnementaux comme l'exposition aux métaux, la pollution, les pesticides augmenteraient également le risque de développer la MA (Killin et al., 2016). A l'inverse, certains facteurs comme l'activité physique ou l'alimentation méditerranéenne ou encore la consommation de caféine sont des facteurs protecteurs (La Rue, 2010; Flaten et al., 2014; Najjar et al., 2019).

La balance entre l'ensemble de ces facteurs de risque génétiques et environnementaux délétères ou protecteurs va conduire au développement ou non de la MA.

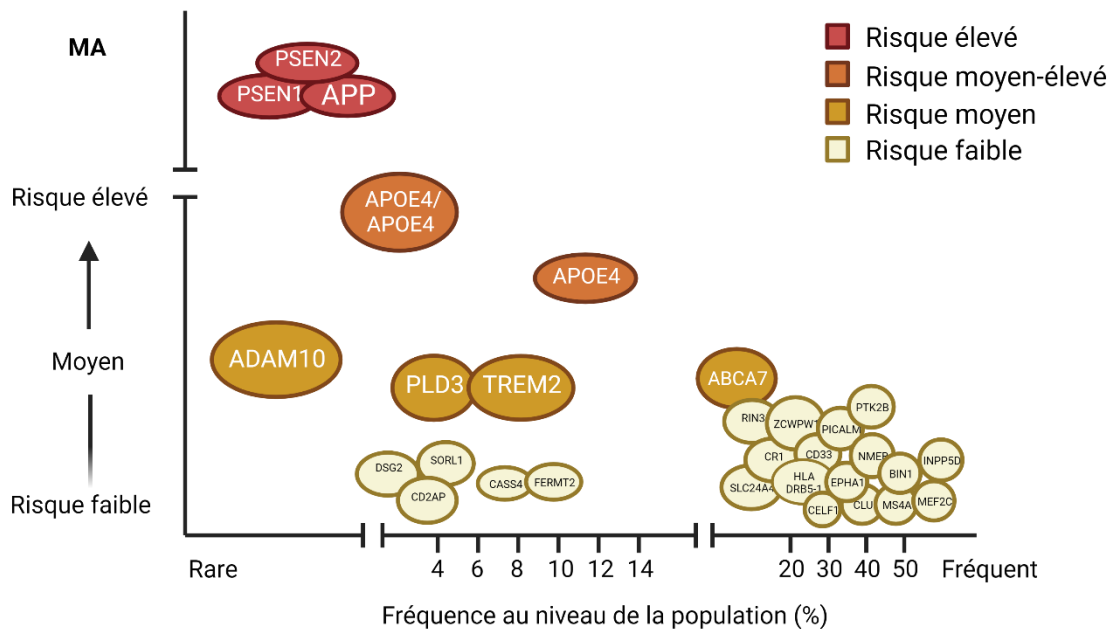


Figure 21 : Variants rares et fréquents contribuant à la MA.

Chaque bulle représente un gène sur lequel un locus à risque de développer la MA a été identifié (sauf pour ApoE 4 pour cause de polymorphisme). Le niveau du risque est représenté sur l'axe vertical et la fréquence au niveau de la population sur l'axe horizontal. Adapté de Karch and Goate, 2015 ; Bellenguez, 2022 ; Holstege et al., 2022.

1.3 La maladie d'Alzheimer et les troubles métaboliques

Si l'âge est le premier facteur de risque de la MA (Rocca et al., 1991), il en existe bien d'autres (cités plus haut). En effet, le syndrome métabolique constitue un facteur de risque important de la MA. Il se définit par la présence d'au moins 3 des critères suivants : tour de taille élevé, hypertriglycéridémie, taux élevé de HDL-cholestérol (*high density lipoprotein*), hypertension artérielle et hyperglycémie. Le diabète de type 2 (DT2) est aussi connu comme facteur de risque. L'étude de Rotterdam, basée sur le suivi d'une cohorte de 6370 sujets âgés, a montré que le risque de démence augmentait significativement chez les sujets atteints de DT2 (Ott et al., 1999), voire doublait le risque de développer la MA et les lésions qui l'accompagnent (Zhang et al., 2017). De plus, les patients atteints de la MA montrent des altérations au niveau de l'homéostasie du glucose et sont plus susceptibles de développer un DT2 (Cholerton et al., 2013; Calsolaro and Edison, 2016; Tortelli et al., 2017). Ces observations ont donné naissance au concept de diabète de type 3

(DT3) se caractérisant par une résistance centrale à l'insuline qui a bien été décrit chez les patients atteints de la MA (Talbot et al., 2012). En combinant les risques associés au diabète et la MA (Ristow, 2004; Haan, 2006), ces patients présentent un risque particulièrement accru de mortalité et de dépendance fonctionnelle avec l'âge et ainsi le risque d'institutionnalisation (Sue Kirkman et al., 2012).

Certaines études menées sur des modèles de diabète montrent également la présence de certains marqueurs de la MA et des troubles cognitifs associés, renforçant l'idée d'un lien étroit entre la MA et le diabète (Moyses et al., 2019). En effet, les souris db/db, un modèle commun de DT2 avec une mutation au niveau du gène codant la leptine, montrent une hyperphosphorylation de Tau (Takeda et al., 2010; Li et al., 2012). Des troubles de la mémoire et des lésions pathologiques du type Alzheimer ont aussi été rapportés chez des souris transgéniques pour APP nourries avec un régime riche en graisse (Ho et al., 2004; Maesako et al., 2012). De plus, croiser des modèles transgéniques pour APP avec des modèles de DT2 aggrave les troubles cognitifs et augmente les niveaux d'A β (Bose and Sarma, 1975; Ramos-Rodriguez et al., 2015).

La MA et le DT2 partagent plusieurs caractéristiques, notamment l'altération de la fonction cognitive, le stress oxydatif, l'inflammation, le dysfonctionnement vasculaire et l'accumulation de l'amyloïde. On pense aussi que l'hyperinsulinémie favorise la compétition entre la dégradation de l'amyloïde et de l'insuline (Qiu and Folstein, 2006). Des études suggèrent que l'hyperinsulinémie pourrait participer au développement de la pathologie amyloïde à travers l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE). En effet, cette enzyme dégrade à la fois l'insuline, l'amyline et le peptide A β , régulant les niveaux de ces différentes protéines. Ainsi, dans les conditions physiologiques l'IDE, sécrétée dans le cerveau par la microglie, empêche la formation de dépôt amyloïde. Dans le cas d'une hyperinsulinémie, il se met en place une compétition entre la dégradation de l'insuline et du peptide A β par l'IDE. D'autres études indiquent d'autres mécanismes impliquant l'hyperinsulinémie dans le développement de la MA. Par ailleurs, bien qu'il y ait une augmentation du niveau d'insuline, celle-ci est le résultat d'une résistance à l'insuline. Ainsi, la liaison de l'insuline à son récepteur n'active pas la voie sous-jacente, n'inhibant pas l'activité de GSK3, une kinase qui phosphoryle la protéine Tau, conduisant donc à une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau (Jolivald et al., 2008; Qu et al., 2011).

Dans notre laboratoire et d'autres, des études se sont focalisées sur le rôle direct de la protéine Tau sur la signalisation centrale de l'insuline et ont montré que Tau est impliquée dans la voie de l'insuline et dans le contrôle de l'homéostasie énergétique périphérique (Marciniak et al., 2017; Wijesekara et al., 2018b). Tau semble ainsi être à l'intersection des deux maladies (Li et al., 2015). En effet, il a été montré que sa délétion induit des troubles de l'homéostasie du glucose. Tau régule négativement la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt (protéine kinase B) de l'insuline en

interagissant avec PTEN (*phosphatase and tensin homologue on chromosom 10*) (Marciniak et al., 2017).

1.4 Tauopathies

L'accumulation intraneuronale et/ou gliale (Kovacs et al., 2017) de la protéine Tau est aussi caractéristique d'une catégorie de maladies neurodégénératives liées à l'âge regroupée sous le nom de Tauopathies. Bien que les Tauopathies non MA, moins répandues par définition, soient également caractérisées par une pathologie Tau, elles diffèrent de la MA et les unes des autres par des caractéristiques cliniques et pathologiques et ont été classifiées originellement par Bernardino Ghetti et Michel Goedert (Spillantini et al., 1998; Lebouvier et al., 2017; Kovacs et al., 2022). Il existe deux types de Tauopathies. Les Tauopathies dites « primaires » se caractérisent par la présence de la pathologie Tau uniquement. Elles regroupent la Tauopathie primaire liée à l'âge ainsi que les dégénérescences lobaires frontotemporales (FTLD) qui incluent la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale (CBD), la maladie de Pick (PiD) et la maladie à grains argyrophiles. Plusieurs formes liées à des mutations sur le gène MAPT font aussi parties des Tauopathies primaires selon la forme de Tau (3R et/ou 4R) qui forme les agrégats observés (**figure 22**) (Götz et al., 2019). Les Tauopathies dites « secondaires » quant à elles peuvent impliquer d'autres types de lésions en plus des lésions Tau comme c'est le cas pour la MA. L'accumulation de la protéine Tau se fait sous plusieurs formes selon la maladie et notamment sous forme de pré-enchevêtrement, d'enchevêtrement neurofibrillaire dans la MA, mais aussi sous forme de corps de Pick, d'inclusions sphériques, neurites dystrophiques, filaments (axonaux) et grains (dendritique).

Disease	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

Figure 22 : Caractéristiques neuropathologiques des différentes Tauopathies (Götz, Halliday, and Nisbet 2019).

La découverte des mutations situées sur le gène MAPT responsables des formes familiales (**figure 23**) de démence est d'un intérêt majeur. Aujourd'hui, on recense plus de cinquante mutations introniques et exoniques issues de 150 familles dans le monde. Ces mutations se situent en grande partie au niveau de l'exon 10 et modifient par conséquent la capacité de Tau à se lier et à stabiliser les microtubules (Rossi et al., 2012). Selon leur localisation au niveau de la chaîne polypeptidique de Tau, les mutations peuvent favoriser l'agrégation par gain de fonction toxique et de pouvoir de nucléation (Chang et al., 2008).

Ces mutations sont ainsi utilisées pour étudier le rôle pathophysiologique de la protéine Tau notamment en les insérant dans des constructions servant à générer des modèles animaux afin de mimer la maladie.

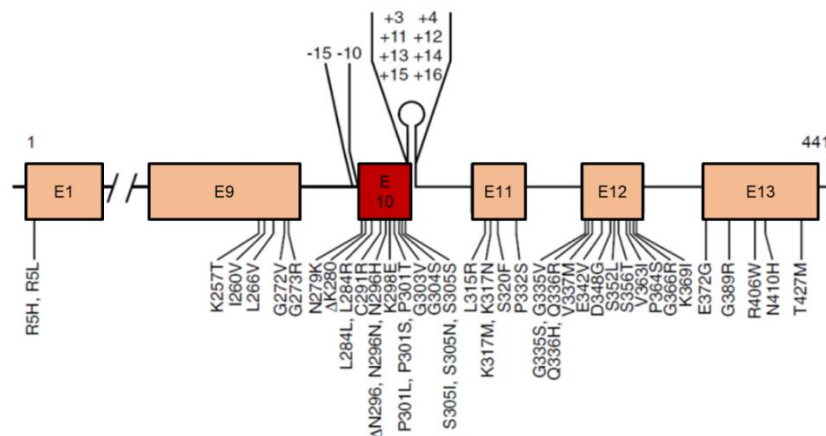


Figure 23 : Mutations identifiées sur le gène MAPT.

47 mutations exoniques et 10 mutations introniques liées à des cas de dégénérescence lobaire frontotemporale sont représentées. Modifié de Goedert et al., 2016.

2 Traitements

A ce jour, il n'existe pas encore de traitement curatif contre la MA. En effet, bien que des centaines d'études cliniques ont été réalisées, aucune n'a montré des effets significativement bénéfiques chez les patients (Cummings et al., 2020). Il existe cependant quelques traitements symptomatiques qui ont pour but de palier aux troubles cognitifs causés par la maladie afin de retarder les symptômes. Différentes molécules sont prescrites comme les inhibiteurs de cholinestérase (donépézil, rivastigmine et galantamine) qui ont pour but d'augmenter le niveau d'acétylcholine dans le cerveau, celui-ci étant diminué chez les patients atteints de la MA, causant des dysfonctionnements synaptiques. Des antagonistes des récepteurs NMDA comme la

mémantine sont aussi prescrits afin de protéger les neurones de l'excitotoxicité (Mattace-Raso, 2014).

Un autre médicament, Adulhelm (Aducanumab) a été autorisé sur le marché par l'agence américaine délivrant les autorisations de mise sur le marché des médicaments, la Food and Drug Administration (FDA), en 2021. Il s'agit d'un anticorps monoclonal développé par Biogen qui tend à diminuer la charge amyloïde sous sa forme soluble et insoluble afin de freiner la détérioration cognitive. Néanmoins, Aducanumab reste en phase de post-approbation pendant 9 ans aux Etats-Unis durant laquelle une validation des effets doit être prouvée. A défaut, l'autorisation de mise sur le marché pourrait être retirée (FranceAlzheimer.org). Cependant, Biogen a retiré sa demande d'autorisation en Europe après un deuxième avis négatif émis par le comité des médicaments à usage humain de l'agence européenne des médicaments (centres-memoire.fr).

Ainsi, compte tenu de la prévalence de la maladie, la recherche pour de nouvelles pistes et molécules thérapeutiques restent à développer afin d'améliorer le diagnostic, la compréhension et la prise en charge. Pour ce faire, la modélisation de la maladie est une étape cruciale pour pouvoir valider et tester d'éventuels traitements. Il existe plusieurs moyens de modéliser au mieux la maladie, pour ma part je vais me focaliser sur les modèles animaux et plus précisément les modèles murins.

3 Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer

Comme certaines formes familiales de la MA ainsi que certaines Tauopathies sont dues à des mutations génétiques, plusieurs modèles transgéniques ont pu être développés dans ce sens afin de mimer les conditions des deux protéinopathies responsables de la MA.

Cependant, avant le développement des outils permettant la manipulation génétique des animaux dans le début des années 1980, des modèles de rongeurs ont été produits par lésions stéréotaxiques de différentes régions cérébrales ou par modulation des neurotransmetteurs par des agents pharmacologiques, permettant par exemple d'imiter une perte de l'innervation cholinergique. De tels modèles ont permis de valider le système cholinergique comme cible thérapeutique dans le cas de la MA. Ainsi, les inhibiteurs de la cholinestérase sont l'une des rares thérapies médicamenteuses dont l'utilité clinique a été prouvée, ces derniers permettent d'augmenter la disponibilité de l'acétylcholine au niveau des synapses du cerveau (Hampel et al., 2018). Avec l'essor des animaux génétiquement modifiés, les premiers modèles animaux transgéniques de la MA sont apparus. Ils se sont basés sur une approche de surexpression des gènes impliqués dans la MA, notamment du gène MAPT codant pour la protéine Tau et de l'APP qui permet la production d'A β , afin d'essayer de mimer les lésions histopathologiques clés de la

maladie. Des modifications génomiques localisées sont maintenant utilisées pour humaniser des séquences précises et introduire des mutations pathogéniques afin d'avoir des modèles plus pertinents.

De façon générale, l'utilisation des modèles animaux vise à reproduire les symptômes et les lésions de la maladie. A ce jour, il existe 213 essais d'animaux transgéniques sur Alzforum.org. Certains modèles de souris ont réussi à reproduire partiellement la maladie, à savoir reproduire les lésions amyloïdes et/ou les lésions Tau. Un modèle de la MA idéal serait un modèle qui engloberait tous les aspects de la pathologie décrits dans le chapitre 2 à savoir la perte neuronale et synaptique ainsi que l'aspect inflammatoire et cognitif en plus des deux lésions caractéristiques. Les modèles animaux sont ainsi un moyen indispensable à ce jour pour étudier l'étiologie et les mécanismes de la neuropathologie ainsi que pour l'élaboration et la validation de potentielles stratégies thérapeutiques.

Il est à noter que la plupart des modèles de MA sont des modèles de souris, les souris C57Bl/6 représentent le fond génétique sauvage le plus répandu (Puzzo et al., 2015). Par ailleurs, à la différence de la souris, chez d'autres espèces, telles que le singe, le chien, le chat ou le microcèbe, des lésions ressemblantes à celles de la MA peuvent apparaître de façon spontanée avec l'âge (Duyckaerts et al., 2008). Toutefois, aucun de ces modèles n'est d'usage commun étant donné la complexité d'élevage, de reproduction (nombre de descendants par portée faible, longue gestation...) et le manque de connaissances de ces espèces. Des études d'inductibilité des pathologie amyloïde et Tau chez le microcèbe ont été conduites et montrent une association avec le déclin cognitif (Lam et al., 2021). L'utilisation du microcèbe prend de plus en plus d'ampleur dans la modélisation de la pathologie ainsi que sur l'axe mécanistique et thérapeutique de la MA.

3.1 Modèles murins de première génération : souris ayant intégré un ou plusieurs transgènes dans son génome

L'insertion des transgènes au niveau de ces modèles se fait sous plusieurs copies par recombinaison non homologue. L'insertion de transgènes humains mutés sous un promoteur fort conduit à une surexpression des protéines à des stades précoces (dès les premiers mois), permettant l'apparition et le développement des lésions. Dans les modèles de la MA, les promoteurs utilisés permettent une expression neuronale.

Dans les modèles que je vais appeler modèles transgéniques « Tg », le nombre et les sites d'insertion du transgène ne sont pas contrôlés et l'expression de celui-ci peut atteindre des niveaux d'expression élevés qui sont susceptibles de déclencher des mécanismes de défense cellulaire indépendants du rôle et de l'expression du transgène en lui-même, pouvant causer des biais dans les analyses ultérieures (Duyckaerts et al., 2008).

3.1.1 Modèles transgéniques murins pour l'amyloïde

Des mutations au niveau du gène APP, identifiées suite à des formes familiales de MA ou encore des mutations au niveau des gènes PSEN1 et PSEN2 ont permis d'obtenir des animaux transgéniques qui surexpriment APP et/ou les présénilines, permettant une production accrue d'A β , et l'apparition de plaques amyloïdes similaires aux plaques séniles humaines ainsi que des troubles cognitifs à un jeune âge (Puzzo et al., 2015).

Les mutations familiales les plus utilisées sur le gène de l'APP sont la mutation Indiana (V717F) qui se trouve au niveau du site de clivage de la γ -secrétase, laquelle augmente le ratio A β 42/ A β 40 (Suzuki et al., 1994) et la double mutation suédoise (KM670/671NL) qui se trouve au niveau du site de clivage de la β -secrétase et conduit à l'augmentation de la production d'A β (Citron et al., 1992). La découverte de ces mutations familiales a donné lieu aux premiers modèles de souris développant des plaques amyloïdes à savoir le modèle PDAPP (V717F) où l'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes et présente des dépôts extracellulaires d'A β , des neurites dystrophiques, une gliose et une perte de densité synaptique et dendritique dans l'hippocampe (Games et al., 1995). La double mutation suédoise a été exprimée quant à elle sous le contrôle de deux promoteurs différents, le promoteur Thy-1.2 qui a donné lieu au modèle APP23 (Sturchler-Pierrat et al., 1997) et sous le promoteur prion du hamster sous un autre fond génétique (B6;SJL) pour générer les souris Tg2576. Ces dernières présentent une production d'APP 5 fois plus augmentée et un phénotype moins agressif que PDAPP et APP23 et développent des plaques amyloïdes vers 12 mois précédées d'une gliose (Hsiao et al., 1996). Le modèle Tg2576 est le modèle le plus utilisé parmi ces modèles de pathologie amyloïde. Par ailleurs, l'apparition de la pathologie est plus précoce quand ces souris (ou d'autres souris mutantes pour APP) sont croisées avec des souris mutées sur le gène PSEN1 PS1(M146L) (Holcomb et al., 1998). Ces souris présentent des dépôts d'A β sous forme de plaques séniles dépendant de l'âge, précédé d'une augmentation des A β 40 et A β 42 solubles.

Les souris APP/PS1 (humanisé au niveau de APP (K670N:M671L) et PS1 (M146L)) présentent des anomalies de la LTP dès l'âge de 3 mois, parallèlement à l'altération de la mémoire à court terme et à l'apparition des plaques (Trinchese et al., 2004; Radde et al., 2006). Ces souris présentent une pathologie amyloïde précoce, permettant une étude plus aisée sur des souris assez jeunes. Cependant, elles ne présentent pas d'autres aspects de la MA tels que les dépôts de Tau. Un modèle de souris plus récent contenant des mutations sur le gène d'APP (Swedish K670N/M671L, Florida I716V, et London V717I) et sur PSEN1 (M146L et L286V) a montré une accumulation d'A β , une astrogliose et une microgliose à partir de 2 mois ainsi qu'une perte synaptique vers 9 mois et une perte neuronale à partir 6 mois mais toujours en absence d'agrégation de Tau (Oakley et al., 2006).

3.1.2 Modèles transgéniques murins pour Tau

D'un autre côté, des mutations sur le gène MAPT responsables de Tauopathies autosomales dominantes (Poorkaj et al., 1998) ont aussi été utilisées pour induire la pathologie Tau chez les souris. De nombreuses mutations trouvées dans les FTLD Tau comme les mutations K257T, G272V, N279K (Gotz, 2001; Zhang, 2004; Rosenmann et al., 2008) ont été utilisées dans des modèles mono ou multi transgéniques de façon similaire aux modèles de pathologie amyloïde.

Le premier modèle de souris (JNPL3) développant des DNF a été généré par expression d'un transgène MAPT humain contenant la mutation FTLD P301L sous le contrôle du promoteur murin prion (Lewis et al., 2000). Ces DNF suivent une topologie différente de celle de la MA. De plus, des enchevêtrements et des inclusions de Pick sont retrouvés dans l'amygdale, les noyaux septaux, l'hypothalamus, le mésencéphale et la moelle épinière (Lewis et al., 2000). La plupart des modèles générés sont basés sur l'expression des isoformes 4R ayant la mutation P301L ou P301S qui sont toutes les deux situées au niveau de la région de liaison aux microtubules (Lewis et al., 2000; Götz et al., 2001; Allen et al., 2002; Higuchi, 2005; Yoshiyama et al., 2007). Ceci est le cas pour le modèle THY-Tau22 par exemple, généré au sein du laboratoire avec l'insertion des deux mutations P301S et G272V sous le promoteur Thy-1.2. Ce modèle développe des DNF à partir de 3 mois associées à une neuroinflammation, des altérations synaptiques et des troubles cognitifs débutant à 7 mois, mais aussi une perte des neurones cholinergiques dans le nucleus septal médian (Schindowski et al., 2006; Belarbi et al., 2011). La plupart de ces modèles mutés développent une DNF agressive qui débute entre 3 et 9 mois. Il existe également le modèle rTg4510 inductible pour Tau où l'isoforme 4R mutée en P301L est exprimée sous le contrôle du promoteur inductible Tet-off CaMKII, permettant de contrôler l'expression de la protéine Tau et le début d'apparition des lésions (SantaCruz et al., 2005a).

La modélisation des événements précoces et de l'apparition progressive de la pathologie Tau peut aider à déchiffrer les mécanismes physiopathologiques conduisant à la DNF et à tester des approches pharmacologiques pour ralentir la progression pathologique. Dans ce contexte, en 2003, la lignée de souris 8c (expression de transgène de Tau via un vecteur de clonage PAC contrôlé par le promoteur Tau et qui produit les isoformes 3R et 4R humaines) développée par Karen Duff et ses collègues a été croisée avec une lignée de souris MAPT KO murine (Tucker et al., 2001) par le groupe de Peter Davies pour générer la lignée de souris hTau avec un profil d'isoformes Tau de type humain (**figure 24A**) (Andorfer et al., 2003). L'expression de Tau 3R est néanmoins supérieure à celle de Tau 4R dans ce modèle. La pathologie dans ces souris est semblable à celle de la MA, avec une accumulation de Tau hyperphosphorylée sous forme de filaments hélicoïdaux agrégés dès 9 mois et le développement de déficits neurophysiologiques et

cognitifs vers 6 mois (Polydoro et al., 2009). Si dans ce modèle, il n'y a pas de mutation sur le gène de Tau ni de pathologie amyloïde concomitante, la DNF observée peut être due au déséquilibre du ratio des isoformes de Tau. En effet, il a été démontré qu'en rétablissant le ratio 3R/4R, il est possible de réduire le nombre de neurones en dégénérescence (Espíndola et al., 2018).

3.1.2.1 *Modèles de propagation de Tau*

Le potentiel de nucléation de la protéine Tau a été montré à plusieurs reprises notamment en injectant des extraits issus de souris P301S. Ces injections ont induit la formation de DNF dans le modèle ALZ17 (exprime la forme 2N4R humaine), qui normalement ne développe pas de filaments ni de pathologie Tau, mais aussi une propagation des lésions du site d'injection aux régions cérébrales anatomiquement connectées. Cette étude met ainsi en évidence la transmission d'agrégats de la protéine Tau (Clavaguera et al., 2009). A la suite des résultats obtenus, Clavaguera et collaborateurs ont réalisé de la même façon des injections intrahippocampiques d'extraits de cerveaux de patients atteints de Tauopathies ou de la MA toujours dans le modèle ALZ17. Ces injections ont donné lieu à des agrégats de Tau neuronaux et gliaux similaires à des astrocytes en touffe caractéristiques de la PSP. L'injection d'homogénats de CBD a produit des inclusions neuronales rappelant les plaques astrocytaires. Avec les homogénats d'AGD, des grains argyrophiles et des inclusions Tau astrocytaires négatives à la coloration à l'argent ont été observés de façon similaire à la maladie humaine. À l'exception de la PiD, les inclusions de Tau se sont propagées dans les régions cérébrales connectées (Ahmed et al., 2014b). Ces résultats soulignent le caractère prion des agrégats de Tau déjà formés dans certaines régions du cerveau du fait de leur capacité à s'autopropager (Clavaguera et al., 2013). Des résultats similaires après l'injection intracérébrale d'homogénats provenant de Tauopathies humaines à des souris non transgéniques ont été obtenus (Audouard et al., 2016; Guo et al., 2016; Narasimhan et al., 2017). Plus tard, d'autres études ont montré que la propagation de la protéine Tau humaine dans le cerveau de souris WT impliquent les neurones et les cellules gliales, principalement les oligodendrocytes, soutenant ainsi l'idée d'un rôle primaire de l'oligodendrogliopathie, avec la neuronopathie, dans la progression des Tauopathies. Les dépôts de Tau observés étaient composés de Tau 3R et 4R phosphorylée et mal conformée indépendamment du type de Tauopathie. De plus, un pourcentage de dépôts intracellulaires de Tau colocalisait avec des kinases de Tau actives (phosphorylées). Ainsi, l'inoculation de Tau humaine modifierait le métabolisme de la Tau murine avec la production et le dépôt de Tau 3R et 4R, et par l'activation de Tau kinases spécifiques dans les cellules affectées (Ferrer et al., 2020). Les différentes conformations de la protéine Tau seraient responsables des caractéristiques variables observées parmi les Tauopathies (Sanders et al., 2014; Kaufman et al., 2016). Pour confirmer la nature *prion-like* de la protéine Tau et l'existence de souches de Tau, il semble également exister une barrière

empêchant certaines souches de Tau de se reproduire ou d'induire l'agrégation d'autres variants de Tau. Chez les souris transgéniques qui expriment la Tau humaine 4R, les extraits contenant des agrégats de Tau 4R induisent une pathologie, tandis que ceux contenant de la Tau 3R ne le font pas (Woerman et al., 2016).

Il est d'autant possible d'envisager un type de "barrière d'espèce". En effet, la propagation n'est possible que s'il existe une similarité structurelle entre l'espèce de Tau qui se propage et l'hôte ou le modèle receveur (Dinkel et al., 2011).

3.1.3 Modèles transgéniques murins pour Tau et amyloïde

Etant donné que les modèles de Tauopathies ne développaient pas de plaques amyloïdes et vice versa pour les modèles amyloïdes, et pour se rapprocher encore plus de ce qui se passe chez l'humain dans un cerveau atteint de la MA, différents croisements entre des souris qui développent des plaques amyloïdes et des souris qui développent des DNF ont été réalisés. Des souris mutantes P301L ont par exemple été croisées avec des souris APP Tg2576, ce qui a augmenté le nombre de neurones en dégénérescence au niveau du système limbique chez les descendants suggérant une synergie entre la pathologie Tau et la pathologie amyloïde qui est apparue au même âge que chez les progéniteurs Tg2576 (Lewis, 2001).

Plus récemment, un modèle triple transgénique 3xTgAD (APP (K670N:M671L), PS1 M146V et TauP301L) a été généré. Ce modèle présente une pathologie A β à l'âge de 6mois (augmentation des taux d'A β 40 et d'A β 42, accumulation intracellulaire d'A β de plaques amyloïdes) qui précède la pathologie Tau avec formation d'enchevêtrements neurofibrillaires vers 12mois (Oddo et al., 2003). Des troubles de la LTP et de la mémoire spatiale sont également détectés (Billings et al., 2005; Kazim et al., 2014; Stevens and Brown, 2015).

3.1.4 Limites de ces modèles

Un grand nombre d'approches thérapeutiques ont montré une efficacité en préclinique sur un ou plusieurs aspects de la pathologie développée par les modèles murins disponibles notamment des réductions de la charge amyloïde ou la charge de DNF avec une amélioration souvent modeste des indices comportementaux. Cependant, un grand nombre d'essais cliniques de traitement de la MA échoue. En effet, aucun modèle de souris disponible ne reproduit complètement la MA et aucun traitement n'a permis de « guérir » complètement la pathologie. La principale limite de ces modèles murins de première génération reste dans les niveaux d'expression des protéines en question qui sont loin des niveaux physiologiques de base suffisants chez l'humain pour le développement de la pathologie. La surexpression d'APP est spécialement critique compte tenu de ces nombreuses fonctions ainsi que les différentes fonctions biologiques de ces fragments protéolytiques qui pourraient plutôt avoir des effets bénéfiques (Ishida et al., 1997) (cités dans la

partie fonctions biologiques de l'APP). Ainsi la surexpression de l'APP dans ces modèles ne permet pas de relier les déficits observés directement à l'accumulation d'A β . De façon similaire, le modèle THY-Tau22 du laboratoire présente une meilleure réponse cérébrale à l'insuline, effet probable de la surexpression de Tau (Leboucher et al., 2019). Une proportion non négligeable de la protéine Tau exprimée ne serait pas pathologique et pourrait en effet avoir des effets bénéfiques. Dans les deux cas, l'interprétation peut être biaisée en conséquence de la surexpression des protéines en question.

De plus, comme ces modèles se basent généralement sur l'insertion du transgène sous le contrôle de promoteurs neuronaux, ils peuvent ne pas tenir compte de rôles potentiels des protéines en dehors du système nerveux central, ni dans les autres types cellulaires cérébraux. Également, l'insertion des transgènes est faite aléatoirement ce qui fait que le locus endogène peut aussi être perturbé ou encore l'expression peut avoir lieu dans des types cellulaires de façon anormale (Saito et al., 2016). Bien que le locus endogène puisse être perturbé par la présence du transgène, l'expression de la forme endogène peut également interférer avec le processus pathologique induit par les protéines humaines exprimées.

Par ailleurs, si le modèle triple transgénique a réussi à intégrer les lésions observées chez l'humain dans une topographie assez ressemblante, aucun cas de MA sporadique ou même familiale n'a été associé à une mutation de Tau. Aucun cas de maladie neurodégénérative n'est causé par une triple mutation sur les gènes APP, PSEN1 et Tau.

3.2 Modèles animaux de deuxième génération ou modèles d'insertion ciblée / recombinaison homologue

Afin de pallier les inconvénients cités pour les souris transgéniques, des modèles animaux d'insertion ciblée ou Knock-In (KI) sont maintenant utilisés. Cette méthode vise à invalider le gène ciblé et à introduire un transgène par recombinaison homologue, ce dernier peut donc être exprimé par remplacement du gène cible sous le contrôle du promoteur murin. Ainsi, on peut s'affranchir de la surexpression mais aussi de la co-expression du gène endogène.

Dans ce sens, et pour pouvoir s'affranchir de la surexpression de l'APP, des stratégies d'insertion ciblée ont été mises en place. Une variante du Knock-In (KI) permet d'insérer un gène modifié uniquement de quelques nucléotides. Sur cette base, Saito et collaborateurs ont généré un groupe de modèles KI où ils ont humanisé la séquence codant le peptide amyloïde au niveau de laquelle la mutation suédoise (KM670/671NL) a été introduite au niveau de l'exon 16 et les mutations arctique (E693G) et/ou Ibérienne (I716F) au niveau de l'exon 17 (Saito et al. 2014). Si la mutation suédoise et la mutation Ibérienne affectent réciproquement le clivage par la β -sécrétase et le clivage par la γ -sécrétase, la production d'A β se voit augmentée ainsi que le ratio A β 42/A β 40 dans

les deux cas. La mutation arctique est la mutation la plus drastique et est connue pour être pro-agrégative. Ceci a donné lieu à 3 modèles différents APP^{NL}, APP^{NL-F} et APP^{NL-G-F}. Ce dernier modèle, qui ne surexprime pas APP (**figure 24B**), présente une altération cognitive dès 6mois (Mehla et al., 2019) ainsi que le développement de la pathologie amyloïde au niveau biochimique dès 2mois (Saito et al., 2014; Masuda et al., 2016). Des études ont montré une altération des performances cognitives au niveau du test de reconnaissance d'objets, le test d'évitement passif et la piscine de Morris vers 6-9 mois (Mehla et al., 2019) et d'autres ont montré une diminution du niveau d'anxiété vers 10 mois grâce au labyrinthe en croix surélevé et au champ ouvert. Au niveau neuropathologique, en plus de développer des plaques amyloïdes, ce modèle présente une astrogliose, une microgliose et une diminution de certains marqueurs synaptiques comme la synaptophysine et PSD95 (Saito et al., 2014; Masuda et al., 2016; Mehla et al., 2019). A l'inverse, les souris APP^{NL} ne présentent pas de dépôts amyloïdes, tandis que les souris APP^{NL-F} développent des dépôts légers accompagnés d'une gliose et d'une perte synaptique à partir de 6 mois.

Tandis que les modèles APP KI sont maintenant largement utilisés, les souris Tau KI commencent à être disponibles depuis peu. L'équipe du Professeur Saido a développé un modèle par approche de recombinaison homologue de façon à remplacer l'intégralité du gène murin *Mapt* par l'orthologue humain. Ce modèle exprime les 6 isoformes de Tau et a été croisé avec les souris APP KI (NL-F et NL-G-F). Les souris double mutantes générées ne présentent pas de Tauopathie ou de

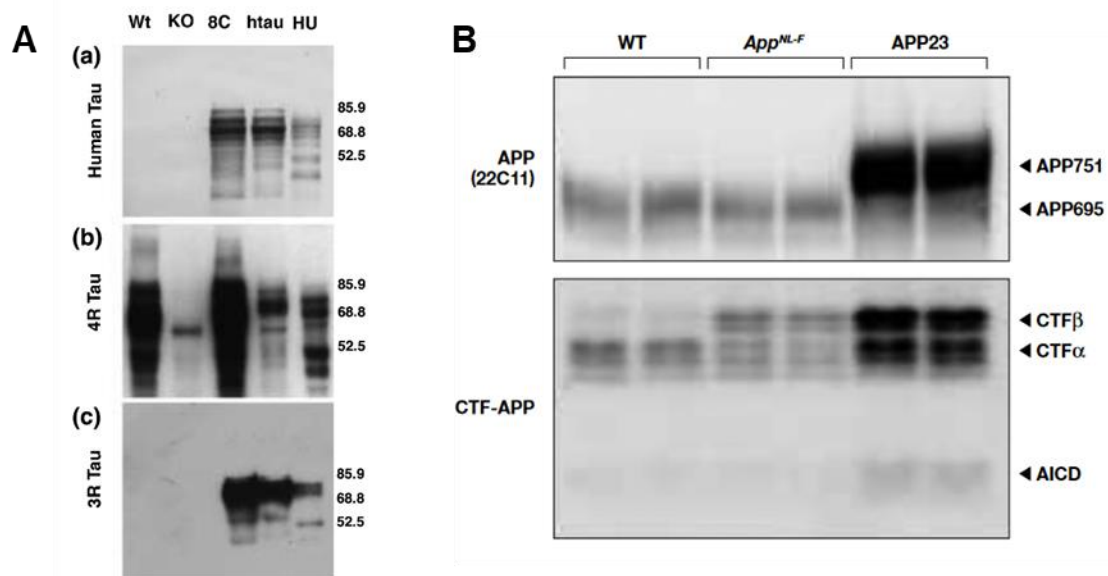


Figure 24 : Différences de niveau d'expression protéique selon le modèle transgénique.

(A) Expression des isoformes humaines de Tau dans les modèles transgéniques surexprimant les 6 isoformes de la Tau humaine avec (8c) ou sans (htai) expression de la protéine Tau murine par rapport à l'expression chez des souris sauvages (WT) et KO pour Tau, et chez l'humain (HU) (Andofer et al., 2003). (B) Surexpression de l'APP et de ses produits de lysés (CTF et AICD) dans des souris transgéniques APP23 comparée à l'expression chez des souris sauvages (WT) et KI (Saito et al., 2014).

DNF de façon similaire aux souris APP KI mais présentent une phosphorylation de la protéine Tau plus élevée (Saito et al., 2019).

3.3 Modèles non transgéniques

Les modèles transgéniques pour la MA sont du plus grand intérêt pour étudier les mécanismes derrière la pathologie et pour développer et tester des stratégies thérapeutiques. Néanmoins, une autre approche pour s'affranchir des mauvaises interprétations liées à la surexpression des gènes liés à la MA ou à la manipulation du génome est de générer des modèles non transgéniques obtenus par injection de Tau ou d'A β directement dans le cerveau par des injections intracérébroventriculaire ou intrahippocampique (Puzzo et al., 2014). Afin de faciliter l'administration directe et de franchir la BHE, il existe deux techniques afin de réaliser ces injections : les injections stéréotaxiques et l'utilisation de canules pré-implantées.

Ces injections intracérébrales permettent d'étudier le rôle direct de l'augmentation aiguë de Tau ou A β . Cette méthode a de moindres coûts par rapport au développement de cohortes transgéniques et peut être appliquée sur différents animaux en plus de la souris tels que le rat ou les primates non humains.

3.3.1 Non transgéniques A β

Ainsi, l'exposition aiguë des structures cérébrales à A β a pu prouver son rôle sur la mémoire notamment la mémoire associative indépendamment des effets de la surexpression de l'APP et des différents produits de clivage (Cleary et al., 2005; Shankar et al., 2008). Cependant, il est à noter que de tels modèles ne prennent pas en considération le temps d'exposition à l'amyloïde, qui est chronique chez les patients atteints de MA. Ainsi, ces modèles ont aussi leurs limites et ne reflètent donc ni les concentrations ni l'évolution de la pathologie.

3.3.2 Non transgéniques Tau

De la même façon que pour A β , la neurotoxicité des oligomères de Tau a été montrée *in vivo* par injection stéréotaxique chez des souris. Les oligomères de Tau ont induit une altération de la consolidation de la mémoire ainsi qu'un dysfonctionnement synaptique et mitochondrial chez des souris sauvages (Lasagna-Reeves et al., 2011). D'autres études montrent également des effets inhibiteurs sur la LTP de préparations oligomériques de Tau sur des tranches d'hippocampes de souris sauvages (Puzzo et al., 2017; Acquarone et al., 2019).

3.4 Conclusion modèles

Si les modèles transgéniques et non transgéniques présentent des limites différentes, il est important de combiner l'utilisation des deux approches selon les hypothèses abordées. Il existe à ce jour plusieurs moyens et modèles pour étudier la MA. Les animaux transgéniques restent des modèles induits qui peuvent ne pas reproduire les mêmes éléments et les mêmes évolutions de la

pathologie mais aussi avoir des effets liés à la surexpression ou encore à des mécanismes de compensation. D'un autre côté, l'utilisation de modèles d'injections intracérébrales est un moyen de cerner les mécanismes de toxicité sans prendre en compte l'aspect chronique de la maladie.

Bien que ces modèles présentent des limites, ils restent un outil de travail utile et indispensable pour aborder les différents aspects de la maladie tels que la plasticité synaptique, la mémoire, les modifications moléculaires et histopathologiques de la MA.

Partie 4 : Interaction Tau/A β

Des analyses par TEP de Tau et A β dans les stades préliminaires de la MA ont montré que même si les deux lésions sont concentrées dans des régions différentes du cerveau, il s'avère qu'elles se croisent au niveau du lobe temporal inférieur et latéral ainsi qu'au niveau du cortex entorhinal ce qui suggère des régions d'interaction entre les deux protéines à des stades précoces (Sepulcre et al., 2016). Le lien entre Tau et A β n'est cependant pas tout à fait établi. Néanmoins, les raisons pour lesquelles les pathologies Tau et A β sont intimement liées restent non élucidées.

1 Hypothèse de la cascade amyloïde

Il est vrai que trois des éléments impliqués dans la voie amyloïdogène à savoir l'APP, PSEN1 et PSEN2 sont codés par les trois gènes identifiés pour causer une forme familiale de la MA. De plus, les premières mutations génétiques responsables de la MA qui ont été découvertes sur le gène de l'APP sont proches des sites de clivages des protéases et sécrétases. Ces mutations favorisent en général la production du peptide amyloïde en favorisant le processus protéolytique au niveau de l'A β et de la γ -sécrétase et peuvent à elles seules conduire au développement de la MA (Citron et al., 1992). En effet, le déséquilibre entre la production d'A β et sa clairance, conduisant à l'agrégation, a fait l'objet de plusieurs sujets de recherche dans différents laboratoires qui ont admis que cet évènement intervient de façon précoce dans la MA et serait donc l'élément déclencheur de la neuropathologie. Par conséquent, en 1992, Hardy et Higgings ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la charge amyloïde est l'agent causant la formation de plaques amyloïdes, lesquelles vont conduire à l'installation d'une neuroinflammation et la formation de la DNF, engendrant la perte neuronale ainsi que la démence (**figure 25**) (Hardy and Higgins, 1992). Cette hypothèse a pris le nom de la cascade amyloïde et suggère donc que la pathologie amyloïde alimenterait le développement et la propagation de la pathologie Tau (Delacourte et al., 2002).

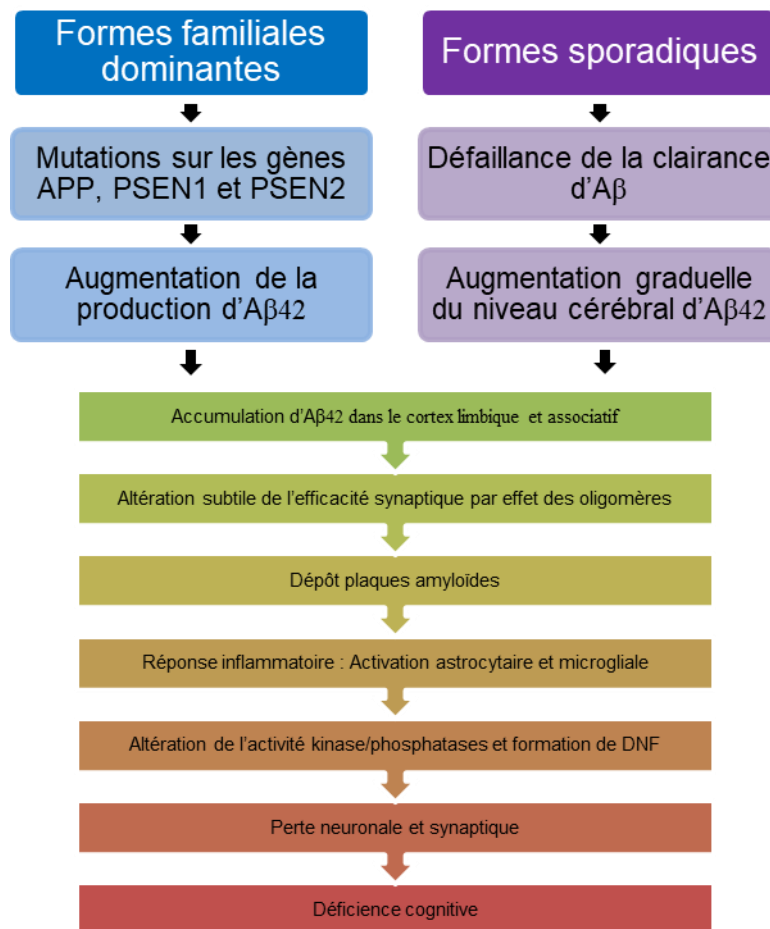


Figure 25 : Séquence des événements pathologiques conduisant à la MA proposée par l'hypothèse de la cascade amyloïde.

La dérégulation de l'homéostasie de l'amyloïde est causée par des formes familiales de la MA ou des formes liées à l'âge ou d'autres facteurs environnementaux ou génétiques. Cette dérégulation entraîne une séquence d'événements pathologiques initiés par l'augmentation d'Aβ42 et la formation d'oligomères d'Aβ qui finissent par entraîner une réactivité gliale et une accumulation de la protéine Tau. Ceci conduit à la dérégulation des réseaux synaptiques et neuronaux et la mort neuronale qui est corrélée au déclin cognitif (Selkoe and Hardy, 2016).

1.1 Arguments en faveur de la cascade amyloïde

De nombreuses découvertes montrent que les oligomères Aβ pourraient jouer un rôle central dans le dysfonctionnement neuronal et la MA (Bao et al., 2012; Uddin et al., 2020). L'hypothèse de la cascade amyloïde a été appuyée par des études montrant un effet d'Aβ sur l'augmentation de la pathologie Tau en favorisant la production d'espèces pro-agrégatives (Bennett et al., 2017). D'autres montrent que les oligomères d'Aβ induisent à une phosphorylation de Tau dans des cultures primaires d'hippocampe (De Felice et al., 2008). Il a aussi été démontré dans des expériences menées sur des cellules d'hippocampe en culture que la charge amyloïde extracellulaire pouvait induire la dérégulation de deux protéines kinases principales impliquées

dans la phosphorylation de Tau (Cdk5 et GSK3) et déclencher ainsi sa dérégulation et une séquence d'évènements conduisant à la dégénérescence neuronale.

1.2 Modèles appuyant la cascade amyloïde

Des expériences d'injections stéréotaxiques ont permis de valider plusieurs hypothèses confirmant l'hypothèse de la cascade amyloïde. Des études ont montré que des lysats de cerveaux humains et murins contenant de l'A β étaient capables d'induire une pathologie Tau chez des souris JNPL3 (P301L) hétérozygotes. La même équipe a précédemment montré une induction de dépôts amyloïdes dans le modèle de pathologie amyloïde APP23 toujours par les mêmes lysats (Meyer-Luehmann et al., 2006). Ceci montre un rôle potentialisateur d'A β non seulement sur une pathologie amyloïde existante mais aussi sur la pathologie Tau en l'absence de plaques amyloïdes ce qui pourrait expliquer la divergence entre la localisation neuroanatomique des dépôts amyloïdes et le développement et la propagation des lésions Tau (Bolmont et al., 2007). Des études similaires ont montré une accélération de la formation de DNF dans un modèle de Tauopathies exprimant l'isoforme la plus longue de Tau mutée P301L sous le contrôle du promoteur Thy1.2 suite à l'injection intrahippocampique de fibrilles synthétiques d'A β 42 (Gotz, 2001). De la même façon, la propagation de Tau suite à l'injection de PHF de Tau dérivés de cerveaux humains est plus élevée chez des souris APP/PS1 et 5xFAD que chez les contrôles non transgéniques. La pathologie est particulièrement exacerbée en termes de neurites dystrophiques associées aux plaques, suggérant que les plaques amyloïdes forment un microenvironnement propice à l'agrégation et la propagation de Tau (He et al., 2018; Vergara et al., 2019). Toutes ces études suggèrent donc que la pathologie amyloïde peut agir en amont de la pathologie Tau et conduire à son développement.

De plus, plusieurs croisements de modèles transgéniques pour Tau et pour l'amyloïde ont permis d'apporter des réponses et des preuves que l'amyloïde agit pour renforcer la pathologie Tau et augmenter sa propagation (**figure 26**). Des croisements comme ceux de souris APP/PS1 avec la lignée inductible rTg4510 (Bennett et al., 2017) ou encore le croisement de lignées Tg2576 ou APP23 avec les souris JNPL3 (Lewis, 2001; Bolmont et al., 2007) montrent une augmentation de la formation de DNF. Une augmentation de plus de trois fois, de la charge de Tau hyperphosphorylée et malconformée a été observée en croisant le modèle du laboratoire THY-Tau22 avec le modèle 5xFAD. Cependant, une diminution du nombre de plaques a été observée chez ces croisements. Ces résultats expliqués par une activation potentielle de la microglie phagocytaire, suggèrent que les changements induits par la protéine Tau dans l'état d'activation microgliale peuvent favoriser la clairance de l'A β (Chen et al., 2016).

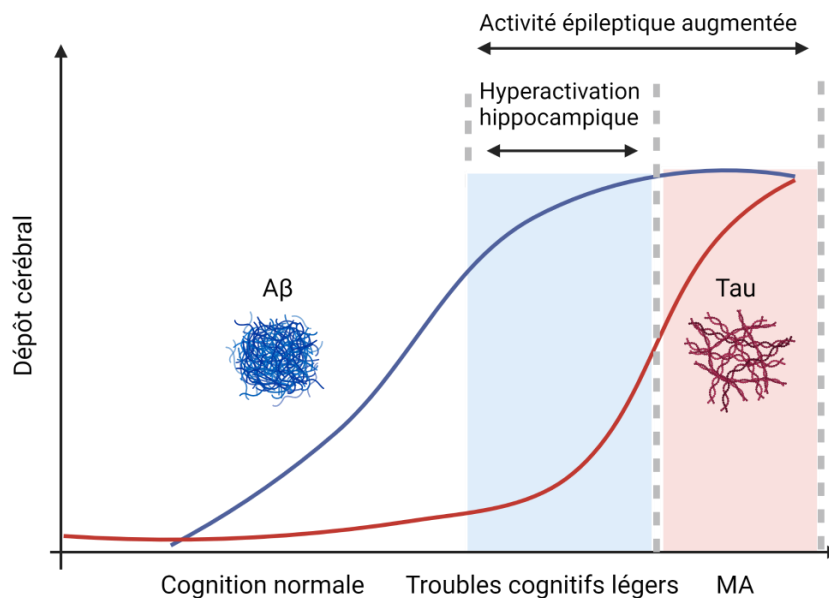


Figure 26 : Modèle de corrélation potentielle entre le dépôt d'amyloïde β et la protéine Tau en rapport avec les altérations du réseau dans la maladie d'Alzheimer.

Associations cérébrales temporelles entre le dépôt d'A β (plaques en bleu) et de tau (enchevêtrements neurofibrillaires en rouge) dans le cerveau. Une activité épileptiforme et des crises peuvent survenir tout au long de l'évolution du déficit cognitif léger et de la MA alors que l'hyperactivité hippocampique est limitée au stade de la déficience cognitive légère. Modifié de Vossel et al. 2017.

1.3 Limites de la cascade amyloïde

La formation des plaques amyloïdes serait une conséquence directe de la production d'A β mais pas de sa neurotoxicité, condition nécessaire mais non suffisante pour déclencher la maladie, puisqu'il est possible d'observer la présence de plaques amyloïdes chez les patients atteints de la MA mais aussi chez les sujets sains. En effet, ce dépôt est un processus physiologique au cours du vieillissement (Selkoe et al., 2012; Carvalho et al., 2018). Il existe des études autopsiques ainsi que des études en imagerie TEP qui montrent qu'une proportion allant d'un quart à un tiers des individus cognitivement sains peuvent présenter une charge amyloïde élevée (Klunk et al., 2009; Villemagne et al., 2011). L'existence de ce groupe sain mais amyloïde positif constitue un défi pour l'hypothèse de la cascade amyloïde. Si le rôle neurotoxique crucial des oligomères et agrégats d'A β était suffisant au développement de la pathologie, ces individus présenteraient des conditions favorables pour le développement de la maladie pourtant ces derniers n'évoluent pas en MA.

D'un point de vue génétique, la forme sporadique de la maladie est beaucoup plus fréquente et implique une douzaine de gènes qui sont considérés comme facteurs de risque de la MA. Le gène le plus important est celui d'ApoE (Tanzi, 2012) qui chez les individus homozygotes augmente de

huit fois le risque de développer la maladie. Finalement, l'APP ainsi que les gènes codant les sécrétases ne sont pas identifiés comme facteurs de risque pour la forme sporadique de la maladie ce qui va à l'encontre de l'hypothèse de la cascade amyloïde.

D'un point de vue thérapeutique, l'immunisation active et passive contre le peptide amyloïde ainsi que les stratégies de renforcement du processus de clairance et les traitements ciblant l'inflammation ont tous connus un succès dans la diminution de la charge en plaques amyloïdes dans les cerveaux de souris transgéniques, ce qui souvent s'accompagnait d'une amélioration du niveau cognitif (Schenk et al., 1999; Cramer et al., 2012). Toutefois, le passage en clinique pour ces stratégies d'immunisation n'a pas eu le même succès, car malgré la diminution de la charge amyloïde, l'état de démence chez de tels patients n'a pas été amélioré (Holmes et al., 2008). D'ailleurs, deux essais cliniques (EMERGE et ENGAGE) pour l'anticorps Aducanumab ont montré une contradiction sur la réduction du déclin cognitif. Des essais multinationaux sont nécessaires pour montrer une amélioration significative de la maladie et étudier le bénéfice clinique de tels anticorps.

2 Hypothèse à double voies

Si A β semble agir en amont sur la protéine Tau et déclencher son processus de pathogenèse, il existe aussi des preuves d'un rôle toxique de Tau sur le peptide amyloïde et réciproquement. En effet, sur un croisement de modèle de Tau inductible avec le modèle APP/PS1, le nombre de plaques amyloïdes ainsi que les neurites dystrophiques associés sont augmentés par rapport aux contrôles de portée mutants APP/PS1 (Pooler et al., 2015). La charge en plaques amyloïdes est aussi augmentée pour le croisement Tg2576 x VLW-Tau qui exprime une Tau humaine mutée (Ribé et al., 2005). Ainsi, il est possible que la pathologie Tau participe au développement et à la progression de la pathologie amyloïde, et réciproquement. En effet, des études ont montré que les DNF ne sont pas suffisantes pour provoquer un déclin cognitif ou une mort neuronale dans ce modèle répressible pour Tau (SantaCruz et al., 2005b). Ce serait donc la combinaison des deux lésions qui conduit à la perte synaptique et neuronale (**figure 27**).

L'hypothèse amyloïde fait l'objet de plus en plus de débats suite à l'avancement des recherches sur la protéine Tau et des interactions entre les 2 protéines *in vitro* et *in vivo*. Le croisement des deux lésions imagées en TEP au niveau du lobe temporal inférieur et latéral ainsi que le cortex entorhinal à des stades précoces (Sepulcre et al., 2016) peut suggérer que les deux protéines agissent ensemble et s'alimentent mutuellement pour induire la maladie. Les plaques séniles, lieu d'accumulation du peptide amyloïde, sont probablement un site important de rencontre entre les deux espèces. Des études suggèrent que l'interaction physique entre les deux protéines pourraient

se faire via le domaine cytoplasmique de phosphorylation de l'APP Thr668. Tau semblerait également agir sur l'accumulation d'A β ce qui favorise l'augmentation de la dystrophie axonale (Shin et al., 2007). Phospho-Tau et A β colocalisent également au niveau des synapses et peuvent agir ensemble et moduler la pathologie indépendamment de leurs accumulations réciproques (Fein et al., 2008).

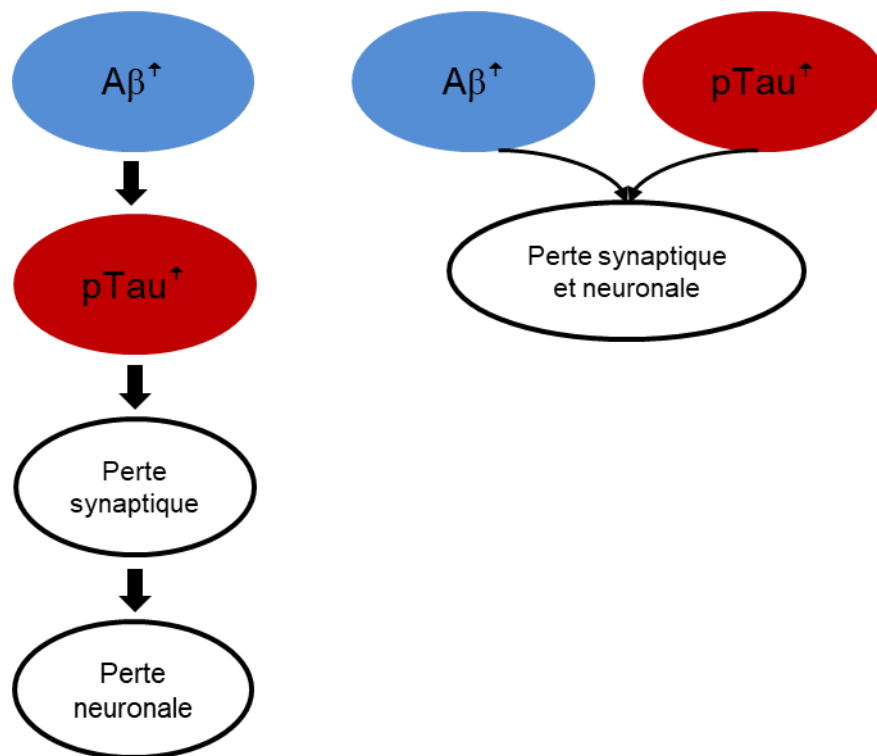


Figure 27 : Modèles hypothétiques d'interaction entre les 2 lésions Tau et amyloïde dans la MA.

(A) Le premier modèle pour modéliser la MA est un modèle en série qui résume la cascade amyloïde où l'accumulation de l'amyloïde cause l'hyperphosphorylation de Tau et son agrégation en DNF et tous les événements sous-jacents conduisant à la mort neuronale. (B) La seconde modélisation en double voie selon laquelle l'augmentation du niveau d'A β et de Tau est régie par des mécanismes différents en amont qui pourraient avoir la même cause moléculaire. Adapté de Small and Duff 2008.

2.1 Mécanismes d'interaction directe A β -Tau

Comme mentionné précédemment, plusieurs données soulignent des effets synergiques de l'A β sur la physiologie de la protéine Tau et son agrégation avant même l'apparition de plaques et de DNF (Bennett et al., 2017; Busche et al., 2019). Les niveaux physiologiques de base sont suffisants chez l'humain pour développer les lésions (Bennett et al., 2017).

Des études *in vitro* ont démontré la liaison et la co-agrégation de l'A β et de la Tau et dans le cerveau sain. La présence d'A β entraîne une résistance relative de la Tau aux protéases, ce qui suggère que l'A β favorise un changement physique de la Tau (c'est-à-dire des MPT, une conformation ou une

oligomérisation) (DeVos et al., 2018a). Si A β et Tau ciblent tous deux les synapses, de façon intéressante, la réduction de Tau protège des dommages causés par A β au niveau de la synapse dans des modèles animaux (Ittner et al., 2010). Plusieurs études ont signalé que les agrégats pathologiques d'A β et Tau peuvent être co-localisés dans les neurones et les terminaisons synaptiques à la fois dans les tissus *post-mortem* humains et les souris 3xTgAD avec une interaction accrue dans les stades ultérieurs de la maladie (Manczak and Reddy, 2013). De façon surprenante, une étude récente par tomographie matricielle de tissus *post-mortem* humains, ainsi que de souris APP/PS1 x rTg21221, a signalé que les synapses étaient positives à la fois pour A β et Tau (de type sauvage) dans moins de 0,02 % des cas (Pickett et al., 2019). Ces données plaident contre une interaction physique majeure des deux protéines au niveau de la synapse. Alternativement, A β et Tau pourraient interagir indirectement par le biais de leur impact sur la physiologie neuronale (c'est-à-dire en activant des kinases, en réduisant la dégradation de Tau, en modulant l'excitabilité et l'expression des gènes) et l'activation gliale.

2.2 Implication de la protéine kinase Fyn dans l'interaction A β -Tau

Dans la recherche de protéines responsables de la phosphorylation des résidus de Tau dans la MA, Shirazi et Wood ont signalé en 1993 une corrélation entre une forte immunoréactivité de la protéine Fyn et la phosphorylation de la protéine Tau dans les cerveaux atteints de MA. La protéine Fyn une tyrosine-kinase appartenant à la famille Src, est retrouvée dans la densité postsynaptique des neurones glutamatergiques. Son rôle dans la régulation de la plasticité en fait une protéine d'intérêt pour la MA. En effet, Fyn serait impliquée dans la transduction du signal et responsable de l'effet toxique de l'A β sur les synapses. Dans un premier temps, il semblerait que les oligomères d'A β se lient à la protéine prion cellulaire PrPC (protéine prion cellulaire) à la surface des cellules neuronales pour activer Fyn via une cascade pathologique et entraîner une augmentation du nombre de récepteurs post-synaptiques au glutamate, phosphoryler les récepteurs NMDA et augmenter leur activité provoquant ainsi une hyperexcitabilité synaptique (Ittner et al., 2010; Busche and Hyman, 2020). Fyn suractivée va par la suite phosphoryler la protéine Tau et participer à son adressage au comportement postsynaptique (Nygaard, 2018). Ainsi, en plus de son rôle dans la signalisation d'A β , Fyn peut s'associer physiquement à Tau et phosphoryler des résidus tyrosines tels que la Tyr18. Fyn et Tau interagissent pour moduler la perte synaptique et les déficits cognitifs chez des souris transgéniques pour APP (Roberson et al., 2011). Des études ont aussi signalé que sans Tau physiologique et fonctionnelle, Fyn est découplée des récepteurs NMDA et la toxicité d'A β supprimée (Ittner et al., 2010). Le rôle conjoint de Tau, A β et Fyn dans l'altération de la fonction synaptique amène une preuve d'une synergie entre A β et Tau, de façon indépendante à leur accumulation, qui conduit à l'altération synaptique et neuronale observée dans la MA (**figure 28**).

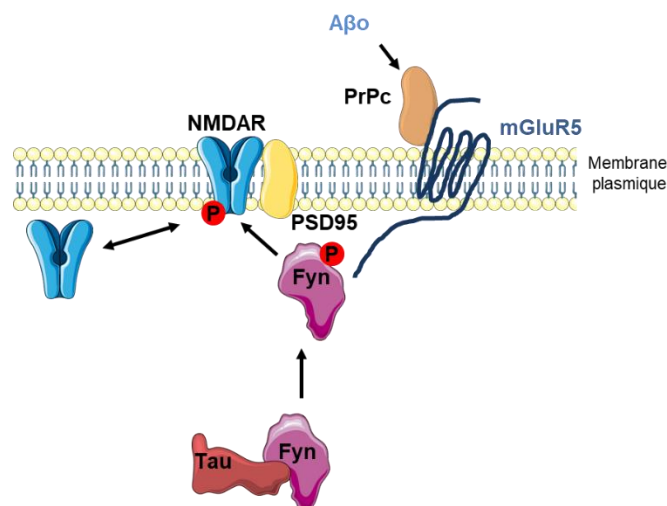


Figure 28 : Excitotoxicité des oligomères Aβ à travers la protéine kinase Fyn.

Les oligomères d'Aβ activent une cascade de signalisation médiée par Fyn et dépendantes de différents récepteurs tels que PrPC et GluR5 (*Ionotropic glutamate receptor*). Ceci provoque une perturbation de l'activité du récepteur NMDAR et entraîne un dysfonctionnement synaptique et neuronal. La protéine Tau est impliquée dans l'adressage de la kinase Fyn au compartiment postsynaptique. Adapté de Nygaard 2018.

3 Effet antagoniste de Tau et Aβ

Plusieurs mécanismes tels que l'altération de la recapture du glutamate dépendant de l'Aβ, le dysfonctionnement des neurones GABAergiques inhibiteurs, la modulation anormale des canaux ioniques et la dégénérescence dendritique ont été reliés à l'Aβ soluble (Zott et al., 2019; Kazim et al., 2021). Celui-ci provoque une hyperexcitabilité neuronale dépendante des niveaux de Tau endogène. La déficience génétique de Tau protège contre l'hyperexcitabilité neuronale et pourrait être expliquée par une perte de fonction de la tyrosine kinase Fyn qui entraîne une réduction du nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate (Ittner et al., 2010).

En revanche, de nouvelles preuves suggèrent que Tau supprime l'activité neuronale indépendamment de la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires. Des études ont signalé une diminution du potentiel d'action spontané des neurones corticaux chez les souris rTg4510 et P301S Tau (Menkes-Caspi et al., 2015; McInnes et al., 2018; Busche et al., 2019). En corrélation avec ces résultats, une étude a révélé que la liaison de Tau à la synaptogyrine-3, une protéine synaptique qui régule l'exocytose, réduit la libération de neurotransmetteurs synaptiques (Marinković et al., 2019). D'autres études sur des tranches de cerveau rTg4510 ont montré qu'une relocalisation distale du segment initial de l'axone réduit le déclenchement du potentiel d'action (Hatch et al., 2017). Des mécanismes postsynaptiques, notamment une réduction du nombre de récepteurs glutamatergiques, ont été signalés (Warmus et al., 2014; Tracy et al., 2016), et la pathologie Tau semble cibler sélectivement les neurones excitateurs (Fu et al., 2019).

L'effet de la co-expression d'APP, A β et de Tau sur la fonction neuronale en imagerie multiphotonique *in vivo* du Ca²⁺ dans le cortex de souris APP/PS1 croisées avec des souris rTg4510 a révélé que l'hyperexcitabilité neuronale A β -dépendante est bloquée par la présence de Tau, qui supprime au contraire l'activité neuronale (Busche et al., 2019). Ce résultat suggère que, du point de vue de l'activation des circuits neuronaux, Tau et A β ont des effets antagonistes.

4 Implication des médiateurs de l'inflammation dans l'interaction A β -Tau

Il est possible que la microglie et les astrocytes soient étroitement impliqués dans les interactions A β -Tau (**figure 29**). Des études ont montré que l'injection de lysats de cerveau contenant de l'A β fibrillaires est susceptible d'induire une pathologie Tau de façon dépendante de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*). L'activation de NLRP3 par A β participerait donc à la phosphorylation et l'agrégation de Tau (Ising et al., 2019). De plus, un nombre croissant de preuves montrent des perturbations de la synapse tripartite glutamatergique, composée d'un terminal présynaptique, d'une épine postsynaptique et d'un processus astrocytaire en conditions pathologiques. Tau et A β peuvent agir seul ou ensemble pour perturber le fonctionnement synaptique de la synapse tripartite, y compris sur la libération du glutamate, l'absorption astrocytaire et la signalisation des récepteurs (Rudy et al., 2015) avec un rôle du récepteur NMDA comme point de convergence possible de la toxicité de l'A β et de Tau via Fyn (**figure 28**). D'autres études ont proposé l'hypothèse que les plaques amyloïdes forment un milieu inflammatoire propice rendant les synapses plus vulnérables aux changements moléculaires associés à la protéine Tau tels que la perte d'expression des protéines synaptiques et conduit par exemple à la perte synaptique. Les protéines synaptiques peuvent être éliminées en partie par phagocytose microgliale. Les auteurs ont identifié par analyse de séquençage d'ARN chez des souris qui surexpriment Tau et A β des participants non neuronaux dans leur interaction. Parmi ces acteurs ils ont retrouvé TREM2, CLU, CD33 ainsi que des membres de la famille de la cascade du complément qui sont identifiés en tant que facteur de risque de la MA (Pickett et al., 2019).

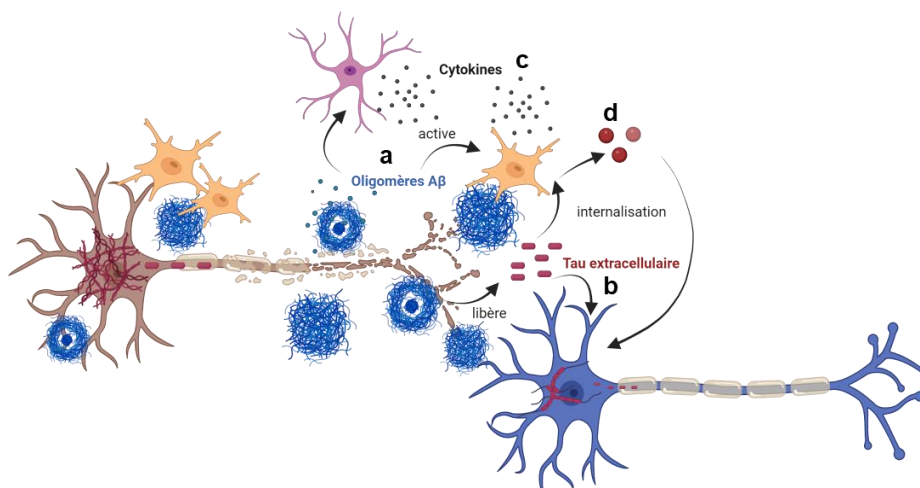


Figure 29 : Accélération et propagation des lésions responsables de la MA.

(a) Les formes solubles d'Aβ ainsi que d'autres facteurs (comme les cytokines relarguées par des oligodendrocytes en sénescence) jouent un rôle fondamental dans l'activation des cellules gliales et (b) l'augmentation de la pathologie Tau en favorisant la production d'espèces pro-agrégatives qui sont internalisées par d'autres neurones et capables de se propager d'une cellule à une autre (possiblement via l'interaction avec LRP1). (c) L'activation des cellules gliales donne lieu à la production de nombreuses cytokines et médiateurs inflammatoires conduisant à une inflammation chronique. (d) Les cellules gliales peuvent jouer le rôle d'intermédiaires entre Tau et Aβ. La microglie est capable d'internaliser Tau et de la libérer à son tour dans le neuropile d'une façon dépendante de l'activité neuronale.

5 Autres hypothèses

Plusieurs processus supplémentaires modulent probablement les interactions Aβ-Tau, notamment les changements vasculaires, le vieillissement, le métabolisme lipidique, la myélinisation, le trafic des vésicules, l'autophagie, la fonction du protéasome, le transport endosomal et la fonction mitochondriale. Certaines données expérimentales suggèrent des effets à la fois indépendants et en interaction d'Aβ ou de Tau sur chacun de ces processus (Busche and Hyman, 2020).

Il est possible d'imaginer que la finalité est le développement de la MA mais qu'il y aurait plusieurs façons différentes pour accéder à cette finalité. Il ne s'agit pas là de réfuter l'hypothèse de la cascade amyloïde mais d'agrandir le cadre et accepter la complexité de la maladie. Plusieurs études ont montré que la MA présente une altération de l'autophagie (Nixon and Yang, 2011) et du fonctionnement lysosomal (Nixon and Cataldo, 2006) ou encore une altération de l'homéostasie du Ca²⁺ due à une activité cytotoxique (Demuro et al., 2010; Supnet and Bezprozvanny, 2010; Szydlowska and Tymianski, 2010). D'autres chercheurs ont montré une perturbation du contrôle du cycle cellulaire neuronal (Kruman et al., 2004; Arendt et al., 2010) sans oublier le rôle central que prend la neuroinflammation dans le développement de la

neuropathologie (Krstic and Knuesel, 2013; Mosher and Wyss-Coray, 2014; Xu et al., 2016). Il a aussi été proposé qu'une cause principale de la maladie pourrait être le dommage oxydatif lié à l'âge ou le dommage à l'ADN (Coppede and Migliore, 2009; Mouton-Liger et al., 2012), ou encore la perte de fonction mitochondriale (Swerdlow et al., 2014). La MA pourrait aussi être due à un trouble du métabolisme du glucose (Cholerton et al., 2013; Ferreira et al., 2014). La formation des plaques séniles et des DNF pourraient également constituer des mécanismes de compensation à l'excès des oligomères solubles.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

La maladie d'Alzheimer est l'atteinte neurodégénérative la plus commune chez les personnes âgées dans le monde. Cette maladie, qualifiée aussi de Tauopathie, progresse lentement pour enfin causer des troubles de la mémoire, des fonctions exécutives et d'orientation dans le temps et dans l'espace. Au niveau cérébral, cette pathologie est caractérisée par une perte de matière cérébrale en général causée par une perte synaptique et neuronale mais aussi par deux lésions caractéristiques qui constituent sa signature neuropathologique : l'accumulation extracellulaire de peptides A β et l'accumulation intracellulaire de protéines Tau. En raison de l'augmentation rapide du nombre de personnes atteintes et des coûts engendrés par la maladie, celle-ci est devenue une préoccupation majeure de santé publique.

Si la recherche sur l'Homme apporte une connaissance indispensable, mieux comprendre la chronologie et les mécanismes de la pathologie nécessite des modèles animaux. Actuellement, le modèle animal le plus répandu reste la souris transgénique. Les modèles existants surexpriment des protéines Tau et/ou A β avec des mutations humaines responsables de formes génétiques autosomales dominantes de Tauopathie ou de la MA et miment imparfaitement la MA.

Par nos travaux, nos objectifs sont dans un premier temps, de s'affranchir de la surexpression exclusive de Tau et A β au niveau du système nerveux. Pour cela, nous avons généré et caractérisé un nouveau modèle *Knock-In* de Tauopathies dont les niveaux d'expression de la Tau humaine mutée se rapprochent des niveaux physiologiques. Dans un deuxième temps, nous souhaitons étudier l'effet de la présence de l'amyloïde de façon aiguë (par injections stéréotaxiques) ou chronique (croisement avec un modèle de pathologie amyloïde) sur la pathologie Tau (accélération et/ou aggravation) dans le modèle de Tauopathie. Nous espérons ainsi obtenir un modèle de la maladie d'Alzheimer susceptible de récapituler plusieurs aspects de la pathologie notamment en termes de déficits cognitifs, d'altération métabolique ou encore au niveau lésionnel et neuroinflammatoire.

Enfin, notre dernier objectif est de tester le potentiel agrégatif et de propagation de la protéine Tau mutée exprimée sous le contrôle du promoteur murin comparée à la protéine Tau de souris.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Animaux utilisés pour l'étude

1.1 Modèles transgéniques

1.1.1 Modèle murin Tau KI

La construction du modèle Tau KI, établie par le laboratoire est basée sur l'insertion ciblée de l'ADNc codant l'isoforme humaine 1N4R mutée P301L de la protéine Tau dans le locus murin *Mapt* au niveau de l'exon 1. Le transgène possède une séquence qui code une série de 14 acides aminés (GKPIPPLLGLDST) au niveau de l'exon 2 et qui permet de suivre son expression, il s'agit d'un tag appelé V5. Une queue polyA ainsi qu'un codon STOP sont aussi rajoutés à la construction (**figure 30**). La génération du modèle a été confiée à la société genOway®.

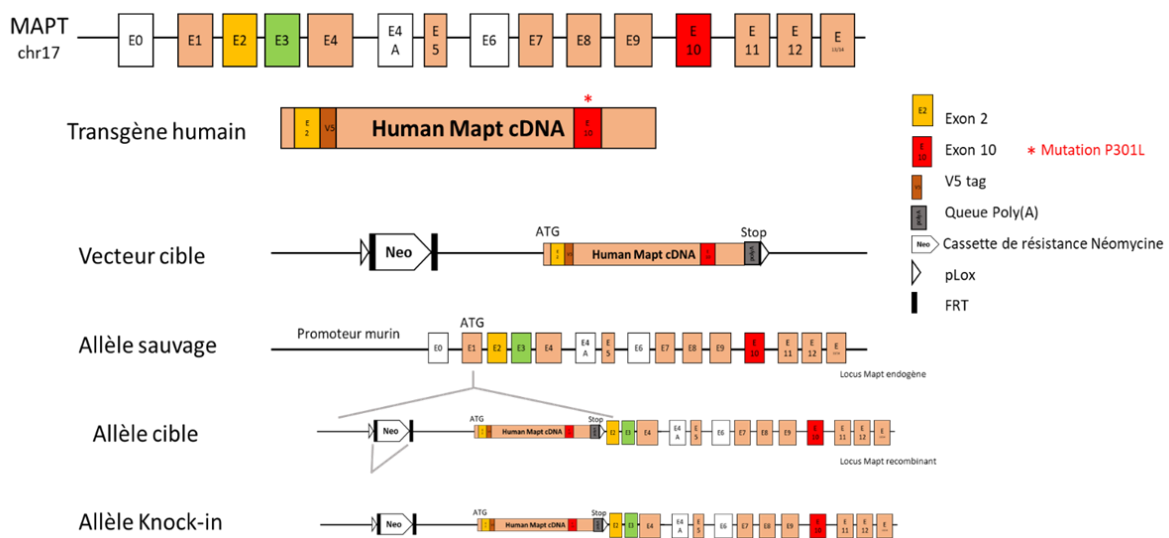


Figure 30 : Stratégie de génération des souris Tau KI.

Le transgène humain MAPT est composé de 10 régions exoniques avec une mutation P301L sur l'exon 10. Une étiquette d'épitope V5 de 14 acides aminés (GKPIPPLLGLDST) a été insérée après l'exon 2. Le codon STOP est inséré suivi d'une queue poly(A). Le transgène est sous le contrôle du promoteur endogène de souris *Mapt*. L'insertion du vecteur cible a été médiée par la recombinaison cre-loxP (sites pLox représentés par des flèches). Une cassette floxée de résistance à la néomycine (Neo) utilisée pour la sélection positive a été retirée par des sites de recombinaison FRT (sites FRT représentés par des rectangles noirs). Modifié de Kraiem et al., 2022.

1.1.2 Modèle murin APP KI

Le modèle APP^{NL-G-F} a été généré par Saito et collaborateurs avec une séquence codant le peptide amyloïde humanisé sous le contrôle du promoteur de l'APP murin (Saito et al., 2014). La mutation Suédoise a été insérée au niveau de l'exon 16. Au niveau de l'exon 17, la séquence contient la mutation Arctique et Ibérienne. Ces mutations entraînent la surexpression de A β 42, peptide plus propice à l'agrégation et donc à la formation des plaques amyloïdes sans surexpression d'APP (**figure 31**). Ce modèle présente une altération cognitive dès 6 mois (Mehla et al., 2019) ainsi que le développement de la pathologie amyloïde décelable par des approches biochimiques dès 2 mois

(Saito et al., 2014; Masuda et al., 2016). Le nombre de plaques observées augmente avec l'âge (Saito et al. 2014). Cependant, ce modèle ne présente pas d'agrégats de Tau ou de DNF.

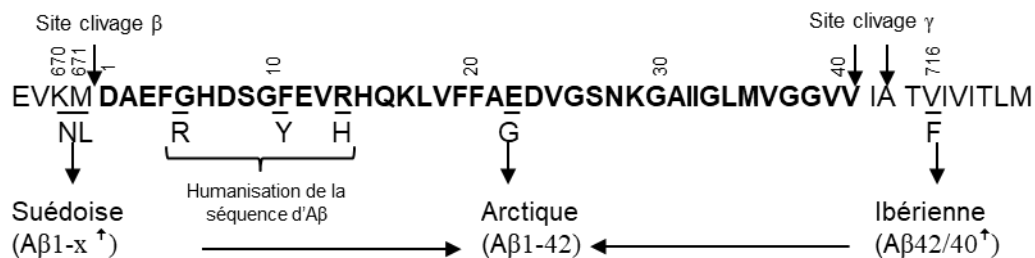


Figure 31 : Représentation de la construction génétique du modèle APP KI (NL-G-F).

Dans ce modèle, la séquence codant Aβ est humanisée et contient 3 mutations : la mutation suédoise au niveau de l'exon 16 et les mutations Ibérienne et Arctique sur l'exon 17. Modifié de Saito et al., 2014.

1.1.3 Croisement Tau KI x APP KI

Afin d'obtenir un modèle avec un taux d'expression qui se rapproche des niveaux physiologiques et qui pourrait présenter les deux protéinopathies, le croisement de ces deux lignées a été fait au sein du laboratoire afin d'obtenir une lignée homozygote pour les deux transgènes humains. Les deux gènes APP et MAPT sont localisés sur 2 chromosomes différents, le chromosome 21 et le chromosome 17 respectivement ce qui a compliqué le croisement permettant d'obtenir des animaux double homozygotes ainsi que les animaux contrôles (**figure 32**).

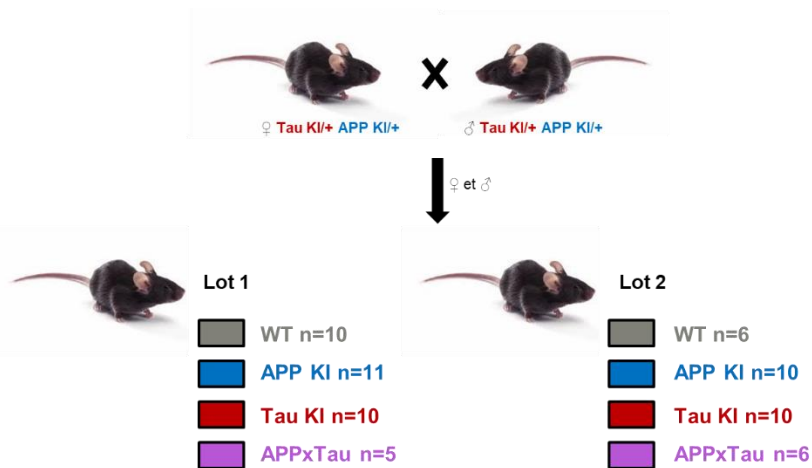


Figure 32 : Croisement et production des souris APPxTau KI.

Les souris double transgéniques exprimant la Tau 1N4R humaine mutée et l'Aβ humanisé muté, les souris simple mutantes APP ou Tau ainsi que leurs contrôles de portées sauvages ont été obtenus par croisement de souris transgéniques hétérozygotes pour APP et Tau. Ces souris transgéniques sont maintenues au laboratoire. Deux lots ont été générés à partir de ces croisements (lot 1 n=36 ; lot 2 n=32).

La caractérisation de ce modèle de souris double homozygotes APPxTau a été fait par rapport aux simples homozygotes et aux souris contrôles littermates (WT) à 6 et 12 mois. Il s'agit donc de

suivre ce nouveau modèle sur le plan métabolique et comportemental mais aussi moléculaire et biochimique dans le but d'avoir un modèle au plus proche de la MA et pouvoir mettre en évidence des dysfonctionnements et/ou une pathologie liée à la co-expression des 2 protéines humanisées. Les expériences ont été d'abord réalisées chez 4 femelles de chaque groupe à 6 mois puis reproduites chez les mâles et les femelles compte tenu du faible nombre de souris double homozygotes mâles obtenues.

1.2 *Fond génétique et hébergement*

Les souris étudiées sont issues de fond génétique C57BL/6J. Le croisement des deux modèles KI mentionnés en section 1.1 a été effectué à partir de souris hétérozygotes. Nous avons ainsi obtenu la cohorte double KI homozygotes ainsi que leurs contrôles de portée sauvages, Tau Ki homozygotes et APP Ki homozygotes.

Les souris sont hébergées dans une animalerie de type EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes et Spécifiques) suivant des cycles de 12h de jour et 12h de nuit, exposées à une température de 21,5 °C et d'humidité entre 35 et 60%. L'accès à la nourriture et à l'eau est libre. Les animaux ont été groupés par génotype dans les cages (Techniplast).

Les protocoles expérimentaux ont obtenu les autorisations du CEEA local (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale) et du ministère (agrément#12787-2015101320441671 v9, CEEA75, Lille, France).

1.3 *Injections stéréotaxiques*

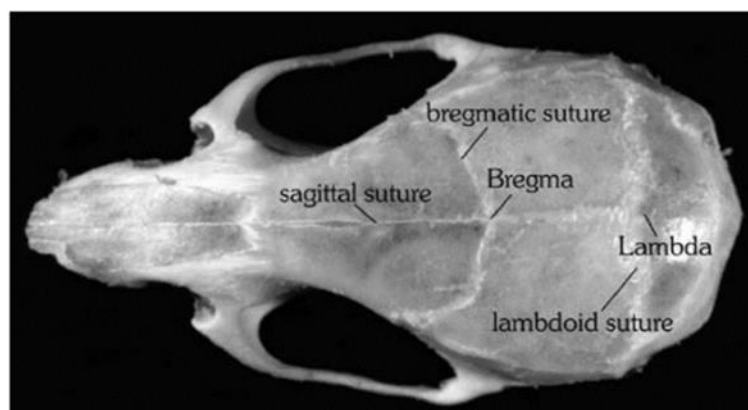


Figure 33 : Anatomie du crâne de souris.

Le repérage en stéréotaxie se fait selon une fontanelle bregmatique qui relie la structure coronale à la structure sagittale (Bregma).

Avant de procéder aux injections stéréotaxiques, les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine à 100mg/kg et xylazine à 20 mg/kg. L'absence de réflexe est vérifiée et la souris est rasée au niveau du crâne. S'en suit une désinfection à la Bétadine et une anesthésie locale à la

Lidocaïne. L'animal est posé sur le cadre stéréotaxique, la barre de gueule et les barres d'oreilles viennent maintenir la position. Une incision longitudinale est ensuite effectuée au niveau du crâne et ce dernier est percé avec une fraise au niveau du site d'injection.

Les lysats sont injectés avec une seringue à aiguille fixe en verre Hamilton de 10 μ L préalablement nettoyée à l'eau et à l'éthanol. Un volume de 2 μ L d'échantillon préparé dans de la solution saline tamponnée (PBS) a été injecté de façon bilatérale au niveau de l'hippocampe selon les coordonnées : -2,5mm ; médial-latéral : +/- 1mm ; dorso-ventral : -1,8mm du bregma (**figure 33**) (Leroux et al., 2022). Le débit d'injection utilisé est de 0,25 μ L/min et afin d'éviter les fuites de matériel injecté, l'aiguille reste en place pendant 5mn. Une fois l'injection finalisée, la peau est humidifiée avec du NaCl pour effectuer les points de sutures et de la Bétadine® en gel est répartie sur la cicatrice, l'animal est placé sous surveillance dans une cage avec tapis chauffant jusqu'au réveil.

Les injections ont été réalisées sur des souris Tau et APP KI à l'âge de 3 mois (n \geq 6 animaux/groupe) selon 3 axes principaux décrits ci-dessous. Les animaux sont injectés et les groupes sont constitués de mâles et de femelles afin d'éviter le biais du sexe :

a) Inoculer du lysat de cerveaux de patients atteints de MA et de sujets sains à des souris Tau KI. Les souris ont été sacrifiées à 1mois post-injection. Les lysats de cerveaux de patients atteints de MA sont issus de deux cas de stade 6 de Braak de sexe féminin et masculin et âgés de 73 et 57 ans respectivement. Les délais *post-mortem* sont de 22 et 23h. Les lysats sains sont issus de sujets de sexe féminin et masculin âgés de 82 et 29 ans avec un délai *post-mortem* de 48 et 20h respectivement.

b) Inoculer du lysat de cerveaux de souris APP KI à des souris Tau KI. Trois points ont été effectués pour cet axe à 1, 2 et 10mois post-injections. En contrôle positif, des homogénats de cerveaux de souris APP/PS1 ont été inoculés à doses équivalentes à des souris Tau KI.

c) Inoculer des lysats de cerveaux de souris Tau KI à des souris APP KI. Les souris ont été sacrifiées à 1 mois post-injection. En contrôle positif, des homogénats de cerveaux de souris Thy-Tau22 ont été inoculés à doses équivalentes à des souris Tau KI.

De plus, des groupes de souris contrôles sont utilisés pour ces expériences : un groupe injecté avec du PBS, un groupe injecté avec un lysat issu de souris sauvage (WT) et un groupe de souris sauvages injectés avec les lysats testés. Au terme de ces expériences, les souris ont été perfusées selon le protocole décrit dans la partie 5.2. L'ensemble des cerveaux ont été analysés en immunohistochimie selon les protocoles décrits dans la partie 9.

2 **Génotypage**

Au moment du sevrage, des biopsies de queues sont prélevées. L'ADN génomique est extrait par le kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel afin de génotyper les portées par PCR (*polymerase chain reaction*).

Pour détecter le transgène Tau, deux couples d'amorces sont utilisés en PCR dont les produits sont migrés sur gel d'agarose 2%. Le premier couple d'amorce permet de détecter la présence ou non du transgène humain et donc de différencier les souris Tau KI (bande à 250pb) des souris sauvages (bande à 350pb). Le deuxième couple d'amorces vise une séquence cible incluse dans la construction afin de différencier deux lignées transgéniques pour Tau du laboratoire (bande à 600pb attendue pour ce modèle).

D'autre part, pour le génotypage des souris APP, deux couples d'amorces sont également utilisés et les extraits d'ADN sont migrés sur gel d'agarose 2%. Ainsi pour la première PCR, une bande de 315pb est attendue pour les WT et une bande de 380pb correspondant à la séquence humanisée est attendue pour les APP avec la deuxième PCR.

3 **Analyses métaboliques**

3.1 **Analyses en cages métaboliques**

Une étude en cages métaboliques a été réalisée à 5 mois sur les femelles du premier lot. Les animaux sont isolés dans la cage métabolique et une phase d'habituation de 72h est prise en compte. Le système permet la mesure continue de leur consommation d'oxygène, leur rejet de gaz carbonique, la prise alimentaire et activité locomotrice pendant 4 jours. La prise alimentaire est évaluée par un système de pesée de conteneurs de croquettes suspendus à la cage. L'activité locomotrice est mesurée par l'interruption de faisceaux de laser qui sont par conséquent enregistrés selon les mouvements détectés.

3.2 **Mesure de glycémie**

Les prélèvements sanguins pour la mesure de glycémie sont effectués le matin en début de phase de jour sans mise à jeun des souris. Une goutte de sang, obtenue après incision de la veine caudale sur animal vigile, est appliquée sur une bandelette OneTouch liée à un glucomètre OneTouch Verio Flew. La glycémie s'affiche en mg de glucose/dL de sang.

4 **Tests de comportement**

Les souris âgées de 6 mois ont uniquement été évaluées au niveau d'un test d'anxiété appelé test d'enfouissement de billes. Différents tests comportementaux ont été réalisés sur le second lot de souris âgées de 12mois. Ces tests ont été conduits au niveau de la plateforme d'explorations

fonctionnelles du pôle recherche de la faculté de médecine à Lille (UMS2014 - US 41 Plateformes lilloises en Biologie & Santé (PLBS)).

4.1 Motricité, test du champ ouvert

Avant d'effectuer les différents de tests de comportement, les capacités ambulatoires et exploratrices des animaux sont évaluées afin de ne pas induire des biais d'interprétations. Ceci est effectué au moyen d'un actimètre infrarouge (45x45x35cm ; Bioseb) divisé virtuellement en deux zones : le centre de l'arène, éclairé à 40 lux et exposé, est considéré comme la zone la plus anxiogène. Deux faisceaux infrarouges permettent ainsi de détecter les mouvements horizontaux et verticaux des souris. Pendant 10min, les souris explorent librement l'arène et plusieurs paramètres tels que la distance parcourue, la vitesse du mouvement, le pourcentage de temps passé au centre et le nombre d'élévation sont évalués au moyen du logiciel Actitrack (Bioseb).

4.2 Tests d'anxiété

Des études ont montré une fréquence élevée de l'anxiété chez les patients atteints de démence (Ferretti et al., 2001). Les différences d'anxiété entre les groupes peuvent interférer avec les différents tests appliqués et ainsi biaiser les résultats et l'interprétation. Il est donc nécessaire d'évaluer ce paramètre. Une souris anxieuse aurait une préférence pour les endroits sombres et fermés et aura tendance à éviter l'exposition à la lumière.

4.2.1 Enfouissement de billes

Ce test est basé sur l'anxiété et le comportement compulsif des souris dans un nouvel environnement. La nouvelle cage et les billes forment un milieu inconnu et anxiogène pour la souris, cette anxiété entraîne l'enfouissement des billes.

Pour ce faire, 18 billes identiques sont placées sur la litière dans une cage neuve et la souris est placée dans un coin de la cage pour 30min d'exploration. Au bout des 30min, le nombre de billes enfouies au moins au 2/3 de leur volume est comptabilisé. Entre deux tests, les billes sont lavées à l'alcool 70% puis rincées à l'eau avant d'être remises dans une cage propre.

4.2.2 Labyrinthe en croix surélevé

Pour ce test, les souris sont placées au milieu d'un labyrinthe en forme de croix surélevé à 50 cm du sol. 2 bras fermés (avec des cloisons) et 2 bras ouverts de 6,5 cm de largeur composent le labyrinthe. Les souris ayant une préférence pour les endroit sombres et fermés, plus une souris passera du temps dans les bras ouverts, plus elle sera considérée comme désinhibées et peu anxieuse. Au début du test, les souris sont placées au centre du labyrinthe avec la tête en regard d'un bras fermé. Le logiciel EthoVision (Noldus Information Technology, Paris, France) permet le suivi vidéo du déplacement de chaque souris sur 5min. De cette façon, le temps passé dans les bras fermés et les bras ouverts est calculé durant la durée de l'acquisition. Ainsi, le rapport du

temps passé à explorer les bras fermés par rapport aux bras ouverts reflète le degré d'anxiété des souris.

4.3 Tests de mémoire

4.3.1 Mémoire à court terme : le labyrinthe en Y

Le test du labyrinthe en Y permet d'évaluer les capacités mnésiques et la mémoire spatiale à court terme. Trois bras identiques constituent le labyrinthe sous forme d'Y qui est entouré de repères visuels. L'un des bras va constituer le bras de départ où la souris est placée au début du test. Durant une première phase d'exploration, un des bras du labyrinthe est fermé par une cloison et la souris peut explorer librement le bras de départ et l'autre bras pendant 5min. La souris est ensuite remise pendant 2min dans sa cage. La cloison est retirée pendant une phase de test où la souris est libre d'explorer les trois bras du labyrinthe pendant 5min. Pendant cette phase de test, une souris sans problème cognitif devrait plus explorer le bras préalablement fermé et qui est considéré comme un environnement nouveau. La distance parcourue par la souris durant le test ainsi que sa vitesse et la durée passée dans les différents bras sont enregistrées par suivi vidéo par le logiciel EthoVision (Noldus Information Technology, Paris, France). Ce test est validé quand le temps passé dans le nouveau bras est, chez le groupe contrôle, plus important que le temps passé dans l'autre bras déjà exploré pendant la phase d'exploration.

4.3.2 Mémoire à long terme : le labyrinthe de Barnes

Le test du labyrinthe de Barnes permet d'évaluer la mémoire spatiale à long terme. Le labyrinthe est constitué d'une plateforme circulaire éclairée par une lumière intense de 800 lux et possède 40 trous équidistants à la périphérie. Une boîte d'échappement noire est placée au-dessous d'un trou cible associé de façon aléatoirement à chaque souris. Ce test est basé sur la préférence à l'obscurité et aux endroits clos pour la souris (boîte d'échappement). Le test se déroule sur 3 phases :

- Une phase d'habituation où chaque souris peut explorer librement le labyrinthe pendant 3min.
- Une phase d'entraînement de 4 jours consécutifs où chaque souris est amenée à apprendre l'emplacement de son trou cible au moyen des repères visuels pendant 3min. La souris est entraînée sur 4 passages par jour à un intervalle de 15min. Au début de chaque essai, la souris est placée dans une chambre en PVC au milieu du labyrinthe, celle-ci est retirée après 15s. Si la souris trouve son trou cible et se réfugie dans la boîte d'échappement le test est arrêté et la souris reste 1min dans la boîte avant d'être remise dans sa cage. En revanche, si la souris ne trouve pas son trou cible dans les 3min, elle est doucement guidée vers la boîte d'échappement pour y rester 1min avant d'être remise dans

sa cage. L'entraînement est validé quand les souris passent de moins en moins de temps à retrouver leur trou cible au fur et à mesure de l'entraînement.

- Une phase de test durant laquelle la boîte d'échappement est retirée, se déroule après 24h et 72h du dernier entraînement. Un seul passage de 2min par souris est réalisé. Le labyrinthe est virtuellement divisé en quatre quadrants : le quadrant cible qui contient le trou cible associé à la souris, le quadrant opposé et les deux quadrants adjacents, Ces trois derniers, constituent les quadrants non cible. Ainsi, le temps passé dans le quadrant cible par rapport au temps passé dans le reste des quadrants non cible, et le temps pour trouver le trou cible définissent si la souris a bien mémorisé la localisation spatiale du trou cible à 24 ou 72h.

Le suivi vidéo des passages est réalisé avec le logiciel EthoVision (Noldus Information Technology, Paris, France). Le nombre d'erreurs effectuées, le temps mis avant de retrouver le trou cible (erreur primaire : nombre d'erreurs effectués avant la première visite du trou cible, latence primaire : temps mis pour visiter le trou cible pour la première fois) ainsi que le nombre d'erreurs totales et le temps de latence total sont enregistrés. Afin de ne pas induire des repères olfactifs et biaiser les résultats, le labyrinthe est nettoyé à l'éthanol 70% après chaque passage et tourné d'un quart de tour dans le sens des aiguilles d'une montre tous les jours.

5 Mise à mort et dissection des souris

5.1 Prélèvement des tissus

Les souris sont sacrifiées par dislocation à l'âge de 6 et 16 mois. Un héli-cerveau est post-fixé au PAF (4% de paraformaldéhyde dans du PBS ; pH=7,4) pour les analyses en immunohistochimie tandis ce que le second héli-cerveau est partagé pour les analyses moléculaires et biochimiques. Les différentes régions du cerveau disséquées sont : hypothalamus (hpt), cortex (ctx), hippocampe (hpc), striatum, cervelet (cvt), bulbe olfactif (BO), tronc cérébral (TC), nerf optique (NO) et moelle épinière (ME). Plusieurs organes périphériques sont également récupérés : yeux, pancréas, muscle, foie, rein, tissu adipeux, cœur. Les prélèvements ont été rapidement congelés dans du 2-Méthylbutane sur de la carboglace puis conservés à -80°C sauf pour le pancréas qui a été directement post-fixé au PAF pour ensuite être inclus à la paraffine pour des analyses en immunohistochimie.

5.2 Perfusion

Afin de privilégier la qualité des immunohistochimies, les animaux âgés de 12 mois ont été perfusés au NaCl 0,9% avant de récupérer les différents tissus pour les analyses transcriptomiques, biochimiques et immunohistologiques de la même façon que pour les animaux âgés de 6 mois. Brièvement, les animaux sont injectés par voie intrapéritonéale avec un mélange

de kétamine à 100mg/kg et xylazine à 20 mg/kg afin de les anesthésier. Une fois que les souris ne montrent plus de réflexe au pincement au niveau de la patte, une thoracotomie est effectuée afin de procéder à une perfusion par voie intracardiaque avec du NaCl 0,9% pendant 5min afin de purger le sang du corps.

Pour les animaux injectés en intracérébral, la perfusion au NaCl est suivie d'une perfusion au PAF (4% de paraformaldéhyde dans du PBS; pH 7,4) pendant 10min pour fixer le cerveau. Les cerveaux entiers sont récupérés pour des analyses en immunohistochimie et sont post-fixés au PAF pendant 24h avant d'être transférés dans du tris-sucrose 20% afin de les cryo-préserver.

6 Analyses transcriptionnelles

6.1 Extraction des ARN

L'extraction des ARN à partir des tissus prélevés est effectuée avec le kit Rneasy Lipid Tissue Mini Kit de Quiagen®. Les tissus sont homogénéisés dans du Quiazol Lysis Reagent® à l'aide d'un polytron à 200rpm. Un volume de 200µl de chloroforme est ajouté à l'homogénat qui est ensuite centrifugé à 12000g pendant 15mn à 4°C. Une phase organique contenant le phénol, le chloroforme et les protéines est obtenue ainsi qu'une phase aqueuse contenant les ARN qui va être délicatement récupérée et mélangée V/V avec de l'éthanol 70%. Le mélange est ensuite passé au vortex 15s puis déposé sur une colonne de silice sur laquelle vont se fixer les ARN par liaison hydrogène. L'ARN est élué dans un volume d'eau *RNase free* (proportionnellement à la quantité de tissu de départ) suite à une série de lavages aux tampon RW1 et RPE du kit qui servent à éliminer les contaminants. La contamination résiduelle est évaluée par le rapport des longueurs d'onde A260/A280 pour les protéines et A260/A230 pour les composés phénoliques lors du dosage de la quantité d'ARN au Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific®) à une longueur d'onde de 260nm. Les ARN sont finalement conservés à -80°C dans les tubes appropriés du kit.

6.2 Rétrotranscription

La rétrotranscription (RT) des ARN en ADNc est réalisée grâce au kit High Capacity cDNA reverse transcription (AppliedBiosystem) à partir de 500ng d'ARN en présence des amorces, du tampon, de dNTPs (mélange des quatre désoxyribonucléotides) et de la transcriptase inverse dans un volume de 20µl. Les échantillons d'ARN sont rétro-transcrits dans un thermocycleur du type gradient Biometra suivant le programme : 25°C pendant 10min, 37°C pendant 2h, 85°C pendant 5min. Les ADNc sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à utilisation pour la PCR quantitative.

Chaque expérience inclue des contrôles négatifs.

6.3 PCR quantitative

6.3.1 PCR quantitative par sondes TaqMan

Dans chaque puits sont déposés 4µl d'ADNc (dilués au 1/10) avec 12µl d'un mélange qui contient 7,5µl de Master Mix (AppliedBiosystems®) et 0,75µl des sondes TaqMan (**Tableau 1**). Le programme qPCR utilisé est le suivant : premier cycle 50°C pendant 2min, 95°C durant 10min et ensuite 40 répétitions 95°C pendant 15s, 60°C pendant 1min. La fluorescence est mesurée après chacun des 40 cycles et résulte du clivage des sondes TaqMan suite à l'élongation par la Taq polymérase.

La cyclophiline (PPIA) est utilisée comme gène de référence. Le cycle seuil (Ct) correspond au nombre de cycles permettant une détection au-dessus du bruit de fond. Les Ct des gènes d'intérêt sont rapportés au Ct du gène de référence pour pouvoir comparer les différentes expressions des gènes en question entre eux.

Tableau 1 : Liste des sondes Taqman utilisées.

	Numéro d'accès	Assay Design	Amplicon (nt)
Souris			
C1qa	Mm00432142_m1	Probe spans exons	80
MAPT	Mm00521988_m1	Probe spans exons	58
PPIA	Mm02342430_g1	Probe spans exons	148
Humain			
MAPT	Hs00213484_m1	Probe spans exons	81

6.3.2 PCR quantitative par SYBRGREEN

Dans chaque puits sont déposés 2µl d'ADNc (dilués au 1/10) avec 8µl d'un mélange qui contient : 5µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems), 2,8µl d'eau RNase free, 0,1µl d'amorce sens et 0,1µl amorce anti-sens (**Tableau 2**). Le programme qPCR utilisé est le suivant : premier cycle 50°C pendant 2mn, 95°C pendant 10 mn et ensuite 40 répétitions 95°C durant 15 s, 60°C pendant 25s puis 95°C pendant 15s. Enfin, une courbe de fusion est effectuée en augmentant la température de 1°C toutes les minutes, en commençant à 60°C et terminant à 95°C (la courbe de fusion est une évaluation des caractéristiques de dissociation de l'ADN double brin lors du chauffage et permet de s'assurer de la spécificité de l'amplification).

La cyclophiline (PPIA) est utilisée comme gène de référence. Le cycle seuil (Ct) correspond au nombre de cycles permettant une détection au-dessus du bruit de fond. Les Ct des gènes d'intérêt sont rapportés au Ct du gène de référence pour pouvoir comparer les différentes expressions des gènes en question entre eux.

Tableau 2 : Liste des sondes SYBRGREEN utilisées.

Nom	Numéro d'accès	Primer sens	Primer anti-sens	Amplicon (nt)
Souris				
Clec7a	NM_020008.2	ATGGTTCTGGGAGGATTGGAT	GCTTTCCTGGGGAGCTGTAT	72
CD68	NM_009853.1	GACCTACATCAGAGCCCGAGT	CGCCATGAATGTCCACTG	95
cFos	NM_022197.2	CGGGTTTCAACGCCGACTA	TTGGCACTAGAGACGGACAGA	166
Cyclophiline	NM_008907.1	AGCATACAGGTCTGGCATC	TTCACCTCCCAAAGACCAC	126
Fosb	NM_008036.2	CCGAGAAGAGACACTTACCCCA	AAGTCGATCTGTCAGCTCCCTC	115
GFAP	NM_001131020.1	CGCGAACAGGAAGAGCGCCA	GTGGCGGGCCATCTCCTCCT	104
JunB	NM_008416.3	CTTTAAAGAGGAACCGAGACC	CGCTTTCGCTCCACTTTGAT	111
Nr4a1	NM_010444.2	AAAATCCCTGGCTTCATTGAG	TTTAGATCGGTATGCCAGGCG	102
Nr4a3	NM_015743.2	GTGGCTCGACTCCATTAAGAC	GTGCATAGCTCCTCCACTCTCT	144
TNFa	NM_013693.2	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACCTCT	116
Vimentine	NM_011701.4	CCAACCTTTTCTCCCTGAAC	TTGAGTGGGTGTCAACCAGA	70
Humain				
APP	NM_001198823.1	CCACCATGAGTCCCATGAT	GATTCAGGATATGAAGTCCACCA	91

6.4 Séquençage de l'ARNm

Les bibliothèques de séquençage (n=4 par groupe) ont été réalisées avec le kit QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit FWD de la marque Lexogen. Il s'agit d'un protocole de génération des séquences proches de l'extrémité 3' de l'ARN polyadénylé. Le séquençage est réalisé avec la technologie Illumina en 100pb sur un Nova6000. Le séquençage est réalisé par la plateforme génomique du pôle Biologie Pathologie Génétique - CHU de Lille.

6.4.1 Construction de bibliothèques de séquençage

La génération de bibliothèques est initiée par l'amorçage d'oligodT (amorce contenant des séquences de liaison compatibles avec Illumina (lecture 2) à partir de 50ng d'ARN. L'ARN est dégradé après la synthèse du premier brin. Ensuite, la synthèse du deuxième brin est réalisée au moyen d'une amorce aléatoire contenant des séquences compatibles avec Illumina (lecture 1) et une ADN polymérase. Des identificateurs moléculaires uniques (IMU) sont introduits afin d'éliminer les doublons de la PCR pendant l'analyse. Ainsi, la bibliothèque d'ADNc double brin est obtenue, elle est ensuite purifiée avec des billes magnétiques et amplifiée. Seize cycles d'amplification sont réalisés pour 50ng d'ARN total. La librairie finale est purifiée et déposée sur une puce à ADN haute sensibilité pour être contrôlée sur le bioanalyseur Agilent 2100 (vérification de la concentration et de la distribution de la taille).

6.4.2 Séquençage

Chaque librairie est regroupée de manière équimolaire et le pool final est également contrôlé sur le bioanalyseur Agilent 2100 et séquencé sur NovaSeq 6000 (Illumina) pendant 100 cycles, l'objectif étant d'obtenir un minimum de 25 Millions de lectures par échantillon.

6.4.3 Analyse des données transcriptomiques

Afin d'éliminer les régions de mauvaise qualité et les poly(A) des reads, un score de 20 est utilisé sur le programme fastp et les séquences de moins de 25pb sont supprimées. Le programme star est utilisé pour les alignements de lectures sur le génome de souris (GRCm39). Le programme

fastp et umi-tools ont été utilisés pour réduire les erreurs et les biais de PCR quantitative grâce à l'introduction des IMU. Le nombre de reads par gène est compté en utilisant FeatureCount. D'autres programmes comme qualimap, FastQC et multiQC ont servi pour le contrôle de qualité des lectures. L'expression différentielle des gènes de l'ARN-seq a été réalisée avec le paquet R DESeq2. La valeur seuil pour les gènes exprimés de manière différentielle était la valeur p padj < 0,05.

L'enrichissement fonctionnel a été réalisé avec les outils DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (Huang et al., 2009) et le logiciel STRING (Szklarczyk et al., 2017). Les analyses ont été faites selon l'ontologie des gènes (Gene ontology ; GO).

7 Analyses biochimiques

7.1 Tissu cérébral humain

Les échantillons issus de la région temporale antérieure (aire 38 de Brodmann) de cerveaux humains de patients atteints de la MA et de sujets sains contrôles sont obtenus auprès de la Neurobanque de Lille avec le consentement du donneur et la protection des données avec examen du comité éthique (déclaration à l'autorité compétente sous le numéro DC-2008-642). Les échantillons humains sont stockés à -80°C .

7.2 Préparation des échantillons

Les prélèvements sont repris dans du tampon Tris-Sucrose 10% à $\text{pH}=7,4$ avec une pastille d'inhibiteurs de protéases et de phosphatase pour 10ml (Sigma Complete Mini EDTAfree) et toujours maintenus dans la glace durant leur préservation. Les échantillons sont ensuite soumis aux ultrasons (30 impulsions de 0,5s à amplitude 40) et homogénéisés sur roue pendant 1h à 4°C . Ils peuvent ensuite être conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les tissus destinés à l'injection stéréotaxique sont repris dans 5 volumes de tampon PBS 0,2M et homogénéisés dans des potters en verre frité puis soniqués (30 impulsions de 0,5s à amplitude 40). Une centrifugation est ensuite effectuée à 3000 g pendant 5 mn à une température de 4°C . Les surnageants sont récupérés et homogénéisés sur roue pendant 1h à 4°C . Des aliquots de 50 μL sont conservés à -80°C .

7.3 Dosage et préparation des protéines

Le kit BCA (pour *Bicinchonic acid Assay*, Pierce™ BCA Protein Assay Kit) est utilisé pour estimer les concentrations des homogénats en protéines. Pour cela, les échantillons dilués au 1/10 ainsi qu'une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) variant de 0 à 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sont disposés dans une plaque 96puits. Le tout est incubé 30min à 37°C avec 200 μl de réactif colorimétrique

dont l'absorbance est mesurée à 560nm avec le spectrophotomètre Multiskan Ascent (ThermoLab Systems) est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

7.4 Western Blot

Les homogénats de cerveaux sont préparés à une concentration finale de 1mg/mL dans un mélange de LDS (lithium dodécyl sulfate de, NuPAGE®), d'agent réducteur (NuPAGE®) et d'eau ce qui permet de leur conférer une charge négative et de dénaturer les protéines. Un chauffage à sec à 100°C est effectué avant le Western Blot. Les échantillons préparés sont déposés sur un gel polyacrylamide précoulé de 18puits (CriterionXT Bis-Tris 4-12%, Bio-rad). Afin de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, les gels sont soumis à une tension de 165V pendant 1h30 en présence de tampon de migration (MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique) SDS (sodium dodecyl sulfate) Running Buffer 20X NuPAGE®). Un extrait de cerveau de patient Alzheimer est utilisé comme témoin positif. Des marqueurs de poids moléculaires sont ajoutés sur chaque gels : 2µl de MagicMark™ (Life Technologies) visible après révélation et 5µl de Novex® (Life Technologies) visible à l'œil nu. A la fin de la migration, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (0,45µm, Amersham) pendant 40min à 100V dans une solution composée de 20% éthanol et 40% de tampon de transfert 10X (glycine 200Mm ; Tris Base 50Mm). Pour détecter les protéines de bas poids moléculaire tels que le peptide amyloïde, 30µg de protéines sont déposés sur des gels de polyacrylamide (CriterionXT Tris-Tricine 16,5%, Biorad) et la migration est réalisée à 125V pendant 1h25 dans un tampon Tris-Tricine (Biorad). Le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose de 0,2µm (Amersham) pendant 30min à 100V. Pour contrôler la qualité du transfert, la membrane est ensuite colorée de façon réversible au rouge ponceau (Ponceau 2R 0.2% ; Acide trichloroacétique 3%). Le rouge ponceau est retiré dans un bain de TNT (Tris-HCl 15Mm ; NaCl 140Mm ; Tween-20 0,5% ; pH=8) avant de passer à l'étape de saturation dans une solution de TNT-lait ou TNT-BSA 5% pendant 1heure (selon l'anticorps qui va être utilisé). L'anticorps primaire (**Tableau 3**) est incubé sur la nuit à 4°C puis la membrane est rincée 3 fois 10min au TNT avant l'incubation avec l'anticorps secondaire IgG (H+L) (Vector) couplé à une peroxydase HRP (*horseradish peroxidase*) (**Tableau 3**) selon l'anticorps primaire utilisé pendant 45min à température ambiante. S'en suit 3 lavages avant de passer à la révélation à l'ECL (*Enhanced chemiluminescence* Healthcare®) qui permet la détection d'un signal chemiluminescent par ImageQuant 800 (Amersham).

Pour chaque membrane, un contrôle de charge est réalisé en incubant un anticorps dirigé contre la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). L'intensité des signaux obtenus peuvent par la suite être quantifiés de façon semi-quantitative et normalisé par rapport au témoin de charge par le logiciel ImageQuant™.

7.5 *Électrophorèse bidimensionnelle*

Pour effectuer une électrophorèse bidimensionnelle, un mélange des extraits de quatre femelles de chaque groupe est réalisé pour obtenir 40µg dans 20µl de tampon Tris-Sucrose 10% à pH=7,4. Un volume de Tris 20mM contenant 2% de SDS est rajouté et les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 mn. Les protéines sont ensuite précipitées dans 10 volumes d'acétone pendant 10mn à -20°C. Après centrifugation à 12 000g pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot est séché 2h sur glace pour évaporer l'acétone. Ensuite, le culot est alors remis en suspension dans 200µl de tampon UTC (8M urée ; 2M thio-urée ; 4% CHAPS ((3-cholamidopropyl) dimethylammonio -1-propanesulfonate)) avant de procéder à la sonication des échantillons (40 impulsions de 0,5 à amplitude 40). Pour la première dimension (isoélectrofocalisation), 1,1µL de tampon IPG pH 3–11, 2,2µL de solution de réhydratation DeStreak (Cytiva) et une trace de bleu de bromophénol) sont ensuite ajoutés. Les échantillons sont déposés sur des bandelettes IPG 3-11 NL de 11cm (cytiva ; pH 3-11) pour une réhydratation passive sur la nuit. L'isoélectrofocalisation est réalisée le lendemain avec l'appareil Ettan IPGphor (GE Healthcare) en appliquant 0,5 kV pendant 1h en palier, 1kV pendant 1h en gradient linéaire, et 6kV pendant 2h en gradient linéaire. Les bandelettes sont ensuite incubées dans trois bains de 10min de tampon d'équilibration (25mM tris-HCl à pH=6,8 ; 20mM DTT ; 10% glycérol ; 5% de SDS ; CriterionXT 0,05% de bleu de bromophénol). Elles sont alors déposées sur un gel de polyacrylamide (CriterionXT Bis-Tris 4-12%) pour la seconde dimension de l'électrophorèse. La migration selon le poids moléculaire se fait selon le protocole de Western Blot précédemment décrit.

7.6 *Préparation des fractions contenant les protéines Tau solubles et insolubles*

Une séparation des fractions solubles et insolubles de Tau a été réalisé à partir de 200µg de l'homogénat hippocampique repris dans 100µl de Tris Sucrose (Tris 10mM ; sucrose 0,32M ; pH=7,4) auquel ont été ajoutés 700µl de tampon de conservation (Tris/HCl 10mM, pH=7,4 ; sucrose 0,32M ; 0,23 % Triton 100X). Après sonication (20 impulsions de 0,5 à amplitude 40), une étape de centrifugation est réalisée pour éliminer les débris tissulaires (5000g, 10min, 4°C). Le surnageant (T: protéines totales) est récupéré. Une ultracentrifugation du surnageant est ensuite réalisée (100000g ; 1h ; 4°C) pour séparer les protéines Tau ultrasolubles (Surnageant S1). Le surnageant est conservé et le culot est repris dans 800µl de tampon Sarkosyl (Tris/HCl 10mM, pH=7,4 ; sucrose 0,32M ; 1% Sarkosyl) et repassé en ultracentrifugation (100000g ; 1h ; 4°C) après sonication (20 impulsions de 0,5 à amplitude 40) de la même façon pour récupérer les protéines Tau solubles (Surnageant S2). Le culot (C) contient les espèces insolubles de Tau (oligomères insolubles et agrégats). Les différentes fractions sont reprises dans une solution de LDS 2X et sont analysés en électrophorèse monodimensionnelle. Les membranes sont révélées avec un anticorps reconnaissant la Tau humaine et la Tau de souris (TauE13N). L'analyse réalisée

par le programme ImageJ est basée sur le calcul du pourcentage relatif des espèces solubles (Surnageants 1 et 2) et insolubles (Culot) par rapport au total des espèces (T).

8 Dosages ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

8.1 *Dosage du peptide amyloïde dans le cortex et l'hippocampe en ELISA*

Les échantillons de cortex ou d'hippocampe ont été préparés en diluant dans du tampon Tris-Sucrose 10% à pH=7,4 pour une concentration finale de 1 mg/ml dans un volume de 20 μ l. Huit volumes (soit 160 μ L) de solution de tampon guanidine/tris froid (5M guanidine-HCl ; 50Mm Tris ; pH=8) sont rajoutés. Les échantillons sont ensuite soniqués (15 impulsions de 0,5s à amplitude 60) et homogénéisés pendant 3h à température ambiante afin de détruire les structures tertiaires du peptide amyloïde. Une dilution au 1/5 dans du tampon BSAT (2,5mM KCl ; 1,5mM KH₂PO₄ ; 135mM NaCl ; 8mM Na₂HPO₄ ; 5% de BSA ; 0,03% de Tween-20 ; pH=7,4) est effectuée dans un volume total de 600 μ l avant d'effectuer une étape de centrifugation à 16000g (Centrifuge 5424R, Eppendorf) pendant 20min à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et utilisé pour effectuer le dosage ELISA. Les échantillons de cortex sont dilués au quart dans le diluant du kit avant le dépôt. Le dosage de la concentration en A β 40 et A β 42 est effectué avec les kits de dosage ELISA de A β humaine (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons ainsi que les contrôles et les standards de gamme sont incubés avec 50 μ l d'anticorps de détection pendant 3h. S'en suit une incubation avec 100 μ l d'IgG anti-lapin couplé à une peroxidase HRP pendant 30min. L'étape de révélation consiste en l'ajout de 100 μ l de chromogène dans chaque puits pendant 30min à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée avec une solution acide fournie dans le kit et l'absorbance est mesurée à 450nm avec le spectrophotomètre Multiskan Ascent (ThermoLab Systems). Quatre lavages sont effectués entre chaque étape, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante. Les quantités d'A β 40 et d'A β 42 sont donc évaluées par rapport à la courbe étalon du fabricant en pg/mL.

8.2 *Dosage de Tau dans le cortex et l'hippocampe en ELISA*

Afin de réaliser le dosage de la protéine Tau par ELISA, les échantillons préalablement préparés sont dilués dans du tampon RIPA2X (100mM Tris base pH=8 ; 300mM NaCl ; 0,2% SDS 4% deoxycholate de sodium).

La concentration en protéine Tau a été déterminée par un système ELISA sandwich développé par le laboratoire. La plaque (Sigma) est incubée sur la nuit avec 100 μ l d'anticorps anti-Tau totale 7B1 (maison, épitope : acides aminés 162-175 sur l'isoforme la plus longues de Tau) ou un anticorps anti-Tau humaine 7C12 (maison, épitope : acides aminés 11-20 sur l'isoforme la plus longue de Tau). Une fois les anticorps adsorbés sur la plaque, celle-ci est saturée avec 300 μ l de PBS-caséine

2% par puits pendant 1h afin de bloquer les sites aspécifiques. Les échantillons dilués au 1/120 (Tau totale) ou 1/32 (Tau humaine) dans un volume final de 50µl ainsi que la gamme étalon sont rajoutés avec 50µl d'anticorps de capture : un anti-TauCter (maison, épitope : 427-441 sur l'isoforme la plus longue de Tau) pour la Tau totale et un anti-Tau E1MB (maison, épitope : acides aminés 23-30 sur l'isoforme la plus longue de Tau) pour la Tau humaine. Après une incubation sur la nuit à température ambiante, la plaque est incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps de détection IgG2b ou IgG1. La révélation est réalisée avec une solution de TMB ('3,3',5,5' tétraméthylbenzidine, Sigma ; 1 tablette pour 10ml de tampon phosphate citrate avec 0,006% de H₂O₂). L'absorbance est ensuite mesurée à 450nm avec le spectrophotomètre Multiskan Ascent (ThermoLab Systems) après arrêt de la réaction avec 50µl de H₂SO₄.

Des séries de lavages sont réalisées entre les différentes étapes avec une solution de PBS-T (PBS 0,2% avec 0,05% of Tween-20).

9 Immunohistochimie

9.1 Préparation des coupes

Après une semaine de post-fixation au PAF à 4°C, les cerveaux sont transférés dans une solution de sucrose à 20% afin de permettre la cryopréservation avant d'être congelés à l'aide d'isopentane refroidi à une température -30 et -40 °C et stockés à -80°C.

Les cerveaux congelés sont ensuite coupés au cryostat (CM3050 S, Leica) à -20°C suivant un plan sagittal et à une épaisseur de coupes de 40µm. Les coupes sont conservées dans du tampon phosphate salin (Sigma) avec 0,2% de sodium azide pour éviter la prolifération bactérienne. Elles sont réparties dans 10puits de façon à avoir une coupe de cerveau tous les 400µm/puits et donc une vue globale sur le cerveau dans chaque puits. Chacun de ces puits servira donc pour une analyse en immunohistochimie.

9.2 Immunohistochimie

Les coupes flottantes sont rincées 3 fois 10min au PBS avec 0,2% triton X-100 (Sigma) afin de les perméabiliser puis un démasquage est effectué à l'acide formique 80% pour les plaques amyloïdes pendant 30min suivis de 6 lavages rapides à l'eau. S'en suit une étape de saturation avec du sérum de chèvre dilué au 1/100 (Vector) dans du PBS pendant 1h à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 10min au PBS avec 0,2% triton avant d'être incubées avec l'anticorps primaire biotinylé (**Tableau 3**) dilué au 1/1000 dans du PBS avec 0,2% triton sur la nuit à 4°C. Le lendemain, une autre série de rinçage est effectuée avant d'amplifier le signal avec le kit d'amplification (kit ABC, Vector) dilué au 1/400 dans du PBS pendant 2h à température ambiante. Après une nouvelle série de lavage, une révélation pendant 1min à la DAB (3,3'-Diaminobenzidine,

Sigma) est effectuée et les coupes sont ensuite transférées dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) avant d'être montées sur lames *Super Frost Slides* (Thermo Fisher) et séchées à température ambiante. Des bains d'éthanol et de toluène sont ensuite effectués afin de déshydrater les coupes. Ensuite, les lamelles sont montées avec du milieu de montage Vectamount Permanent (Vector) pour pouvoir être observées et scannées à l'aide d'un Zeiss Axioscan. La quantification du signal dans les régions d'intérêt est effectuée en utilisant une macro personnalisée sur le logiciel ImageJ.

9.3 Immunofluorescence

De la même façon que pour l'immunohistochimie visible, les coupes du cerveau sont tout d'abord perméabilisées au PBS avec 0,2% triton. Elles sont ensuite incubées avec du sérum de chèvre dilué au 1/100 (Vector) pendant 1h à température ambiante avant de mettre l'anticorps primaire (**Tableau 3**) dans du PBS Triton à 4°C sur la nuit. 3 lavages de 10min sont ensuite réalisés avant d'incuber les coupes avec l'anticorps secondaire (Alexa Fluor® Conjugated dilué au 1/1000 dans du PBS-Triton) couplé à un fluorophore selon l'espèce de l'anticorps primaire (**Tableau 3**) et l'étape de saturation pendant 1h à température ambiante. Pour faire les doubles marquages, les anticorps primaires sont incubés chacun sur la nuit avec une série de lavage entre les 2 incubations. Pour les anticorps Iba1 et GFAP, les anticorps primaires ainsi que les anticorps secondaires correspondants sont incubés simultanément. S'en suit une incubation avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, Sigma) dilué au 1/5000 dans du PBS pendant 5min. Les coupes sont rincées 3 fois avec du PBS puis transférées dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) pour enfin être montées sur lames *Super Frost Slides* (Thermo Fisher) puis lavées à l'éthanol 70% et traitées avec 0,3% de Noir Soudan (Millipore) pendant 5mn afin d'éliminer l'auto-fluorescence. Afin de visualiser les coeurs denses des plaques amyloïdes, cette étape est précédée par un traitement avec 1% de thioflavine-S pendant 30mn et une série de lavage à l'éthanol 80% et 90%. Les lamelles sont ensuite montées avec du milieu de montage *Dako Fluorescence Mounting Medium* (Agilent). Les images d'immunofluorescence sont observées au microscope confocal Zeiss Spinning Disk ou la totalité des coupes scannées avec un Zeiss Axioscan Z1. La quantification des surfaces marquées en immunofluorescence dans les régions d'intérêt est effectuée en utilisant une macro personnalisée sur le logiciel ImageJ.

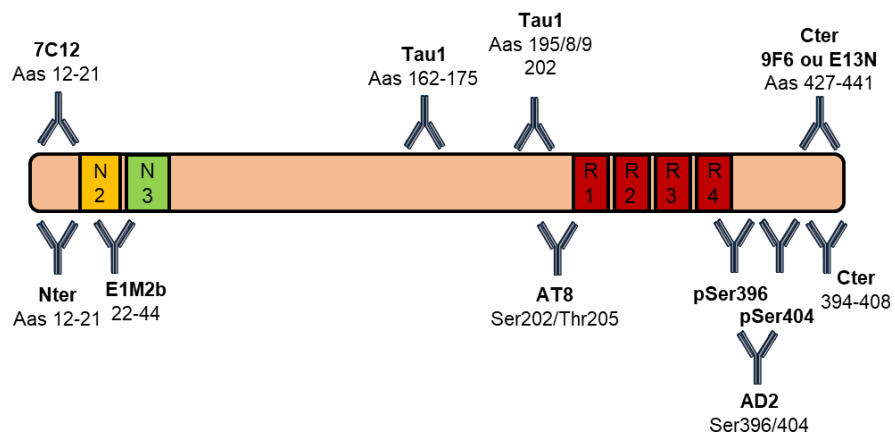


Figure 34 : Principaux anticorps anti-Tau utilisés.

Les sites sont représentés par rapport à l'isoforme 2N4R (441 Aas) sans mise à l'échelle.

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés.

Anticorps	Dilution	Fournisseur	Référence	Espèce
Immunohistochimie anticorps primaires				
6E10 (biotinylé)	1/1000	Biolegend	803009	Souris
anti-GFAP	1/1000	DAKO	Z0334	Lapin
anti-Iba1	1/500	Abcam	ab5076	Chèvre
Anti-Phospho-Tau (AT8) (biotinylé)	1/500	MN1020	MN1020	Souris
anti-V5	1/10000	millipore	AB3792	Lapin
Immunohistochimie anticorps secondaires				
Alexafluor donkey anti-Goat 647	1/500	Invitrogen	A11057	Âne
Alexafluor donkey anti-Rabbit 568	1/500	Invitrogen	A31573	Âne
Alexafluor goat anti-rabbit 488	1/1000	Invitrogen	A11004	Chèvre
Goat anti-mouse IgG biotinylated	1/400	Vector	ZF0805	Chèvre
Goat anti-rabbit IgG biotinylated	1/400	Vector	BA1000	Chèvre
Biochimie anticorps primaires				
6E10	1/1000	Biolegend	803001	Souris
AD2	1/4	Maison	9414	Souris
anti-APP C17	1/10 000	Maison	1003542071	Lapin
anti-GAPDH	1/50000	Sigma	G9545	Lapin
anti-Munc18	1/1000	Sigma	M2694	Lapin
anti-phospo-Tau (pSer396)	1/10000	Invitrogen	44-752G	Lapin
anti-phospo-Tau (pSer404)	1/1000	Invitrogen	44758G	Lapin
anti-PSD95	1/1000	Abcam	ab18258	Lapin
anti-SNAP25	1/1000	santacruz	sc-376713	Souris
anti-Synaptogyrine3	1/1000	Santacruz	sc-271046	Souris
anti-Syntaxine1	1/1000	Synaptic System	110011	Souris
anti-Tau C-ter (394-408)	1/4000	Maison	99351	Lapin
anti-Tau C-ter (427-441)	1/1000	Maison		Souris
anti-Tau Cter 9F6	1/1000	Maison		Souris
anti-Tau E1M2b	1/500	Maison		Souris
anti-Tau Nter	1/1000	Maison	12-21	Lapin
anti-Tau1	1/10000	Millipore	MAB3420	Souris
anti-Tau7C12	1/1000	Maison		Souris
anti-TauE13N	1/1000	Maison		Souris
anti-TauE7	1/1000	Maison		Souris
anti-V5	1/10000	millipore	AB3792	Lapin
anti-Vamp2	1/1000	Cell signaling		Lapin
anti-Synaptobrevine2	1/2000	Synaptic System		Souris
anti-βactine	1/10000	Sigma	A5441	Souris
Biochimie anticorps secondaires				
Goat anti-mouse	1/50000	Merck Millipore	AP200P	Chèvre
Goat anti-Rabbit	1/5000	Vector	PI1000	Chèvre

RÉSULTATS

Etude 1 : Caractérisation phénotypique du modèle Tau KI

Une première étude est menée sur des souris issues d'un croisement de souris Tau KI hétérozygotes permettant d'obtenir des souris Tau KI homozygotes (Tau HO) et des contrôles de portée sauvages (WT). Cette cohorte de souris est étudiée sur un niveau métabolique et comportemental pour étudier l'effet de l'expression de la Tau humaine mutée insérée sur ces deux paramètres étroitement liés à la MA. Ensuite, l'état de la pathologie Tau dans ce modèle est évalué afin d'observer d'éventuels changements sur la modification post-traductionnelle et l'expression de la protéine de Tau, sur sa solubilité ainsi que son agrégation dans le cerveau. Ceci est réalisé par différentes approches transcriptomique, biochimique et immunohistochimique.

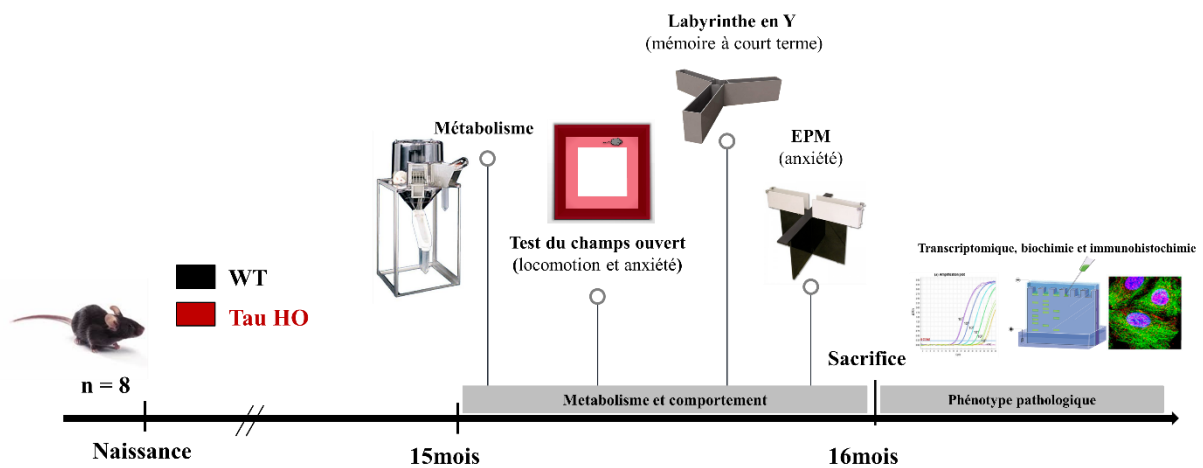


Figure 35 : Schéma illustrant les différents tests effectués sur les souris Tau âgées de 16 mois.

Un mois avant le sacrifice, les souris sont évaluées en cages métaboliques puis en tests de comportement (test du champ ouvert, labyrinthe en Y et labyrinthe en croix surélevé) pour évaluer les niveaux d'anxiété ainsi que la mémoire à court terme. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 16 mois pour être analysées moyennant différentes techniques en transcriptomique, biochimie et immunohistologie.

1 Etude métabolique

Plusieurs études épidémiologiques montrent une relation entre la MA et le diabète (Biessels et al., 2006; Cheng et al., 2012; Livingston et al., 2017). Ce lien est aussi démontré au moyen de travaux réalisés sur des modèles murins (Benedict and Grillo, 2018). Ainsi, le développement d'une résistance centrale à l'insuline (RCI) marquée par une hyperinsulinémie ou une hyperglycémie (Matsuzaki et al., 2010; Tortelli et al., 2017) chez les patients atteints de MA a donné lieu au concept de diabète de type 3. De la même façon que pour la MA, les patients atteints de Tauopathies, du fait d'un gain de fonction toxique ou de perte de fonction qui découle des

modifications de phosphorylation et des niveaux d'agrégation de la protéine Tau, présentent souvent des troubles du métabolisme de glucose (Ahmed et al., 2014a).

Il est intéressant de ce fait d'évaluer l'effet de l'expression de la protéine Tau humaine mutée dans notre modèle Tau KI sur différents paramètres métaboliques à l'âge de 16 mois. Une mesure continue du poids a été effectuée dès le sevrage des souris. De manière similaire à des modèles de délétion de la Tau murine (KO) (Leboucher et al., 2012), les souris Tau KI développent avec l'âge un poids significativement supérieur aux souris contrôles (WT) (**figure 36A**). Pourtant, une moindre consommation alimentaire pendant la phase de jour (**figure 36B**) et une dépense énergétique diminuée pendant la phase de nuit par rapport aux contrôles (**figure 36C**) sont observées. Néanmoins, le niveau du bilan énergétique journalier ne présente pas de différence entre les deux groupes (**figure 36D**). Ainsi, Il semblerait que les souris Tau prennent du poids par rapport aux souris contrôles et compenseraient en mangeant moins ce qui a pour conséquence directe une diminution des dépenses énergétiques.

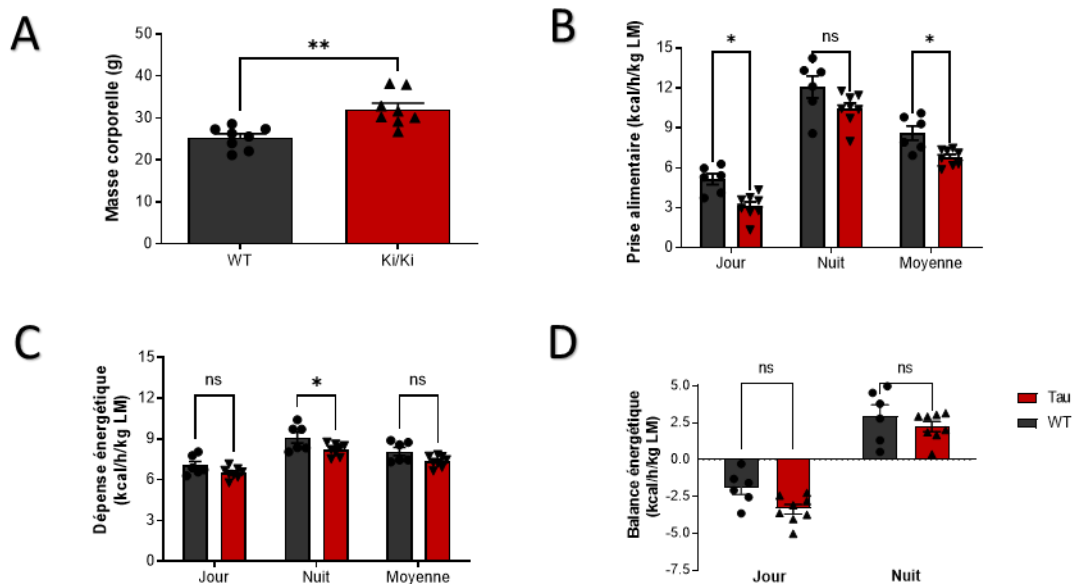


Figure 36 : Troubles du métabolisme chez les souris Tau à 16 mois.

(A) Evaluation du poids (en g), (B) de la prise alimentaire (en kcal/h/kg de masse maigre), (C) des dépenses énergétiques (en kcal/h/kg de masse maigre) et (D) de la balance énergétique (en kcal/h/kg de masse maigre) des souris Tau KI âgées de 16 mois dans des cages métaboliques pendant la phase de jour (12h) et la phase de nuit (12h). n=8 par groupe. Statistiques : (A) t-test (B-D) Two-way ANOVA. *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, ns p>0,05. Les résultats sont exprimés en moy±sem.

Du fait des perturbations du métabolisme perçues au niveau du modèle concordant avec les études épidémiologiques qui associent syndrome métabolique et démences telles que la maladie d'Alzheimer (Calsolaro and Edison, 2016; Gratuze et al., 2018), nous avons voulu démontrer un effet de l'expression de la protéine Tau humaine mutée potentiellement pathologique (mutation

P301L pro-agrégative) sur le développement de troubles métaboliques en soumettant le modèle à des conditions de stress qui favorisent une insulino-résistance périphérique avec une alimentation riche en graisse (*High fat diet*, HFD) en comparaison à une alimentation contrôlée (*Chow diet*).

2 Troubles d'homéostasie du glucose dans le modèle Tau KI

Pour faire suite au travail réalisé au laboratoire qui constitue une preuve du rôle important de la protéine Tau dans le contrôle de l'homéostasie énergétique périphérique et dans la régulation de la signalisation centrale à l'insuline (Marciniak et al. 2017), l'objectif des travaux sur le modèle Tau KI est de démontrer un lien entre une perte de fonction de Tau et le développement de troubles de l'homéostasie du glucose. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Hamza Benderradji et sous la supervision des Drs. Valérie Buée-Scherrer et David Blum. L'ensemble des résultats obtenus ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « *Frontiers Molecular Neuroscience* » et sont présentés sous la forme d'un article intitulé « *Impaired Glucose Homeostasis in a Tau Knock-In Mouse Model* » (**en annexe**).

Dans ce travail, les effets de l'expression d'une protéine Tau mutée sans surexpression, sur le développement de troubles de l'homéostasie du glucose ont été étudiés (les tests réalisés sont détaillés en **supplementary figure 1** de l'article).

En accord avec les observations faites dans le modèle Tau KO, cette étude a permis de mettre en évidence chez des souris Tau KI homozygotes (HO) mâles (pas d'effet chez les femelles) sous régime riche en graisse (de 2 à 5 mois), des troubles de l'homéostasie glucidique se traduisant par une intolérance au glucose lors de l'IPGTT (test de tolérance au glucose en intrapéritonéale), des glycémies élevées en périodes post prandiales après un jeûne prolongé ainsi qu'une insulémie élevée à l'état basal (**figure 2** de l'article).

La protéine Tau étant également présente dans les organes périphériques tels que le pancréas (**figure 5** de l'article), son invalidation ou sa surexpression dans les îlots de Langerhans entraîne une altération du trafic et de la sécrétion de l'insuline par dysfonctionnement des cellules β (Wijesekara et al., 2018a). De ce fait, l'ensemble de nos résultats appuie le rôle d'un dysfonctionnement des îlots pancréatiques sur le métabolisme du glucose plutôt qu'une insulino-résistance (évaluée par analyse de phospho-Akt et d'adiponectine circulante, deux paramètres moléculaires clés qui sont altérés au cours de l'insulinorésistance en **supplementary figure 4** de l'article).

Au vu de nos analyses, la capacité de Tau à réguler l'homéostasie du glucose n'est observée que chez les mâles dans le même sens que les études de délétion de Tau précédemment réalisées au sein de notre laboratoire (Marciniak et al. 2017) qui ont aussi été réalisées sur des souris mâles. Un dimorphisme sexuel est ainsi observé du fait de la résistance des femelles soumises au régime riche en graisse par rapport aux mâles (Oliveira et al., 2015). En effet, l'augmentation de signalisation des récepteurs d'œstrogènes, les différences de méthylation de l'ADN des îlots, les différences d'expression des gènes antioxydants et des facteurs de transcription des gènes enrichis des îlots sont suggérés comme facteurs qui permettent aux femelles de mieux tolérer le HFD que les mâles.

3 Troubles liés à l'expression de la Tau humaine mutée dans le modèle Tau KI à l'âge de 16 mois

Afin d'évaluer d'éventuels déficits cognitifs ou perturbation du comportement liée à l'expression de la protéine Tau humaine, les souris ont été soumises à différents tests de comportement. Ces tests servent à évaluer la locomotion, l'anxiété, la capacité d'apprentissage et la mémorisation à court et long terme des souris. La comparaison est faite par rapport à des souris sauvages qui expriment donc une protéine Tau sauvage de souris. Ensuite, le niveau d'expression, l'état de phosphorylation et d'agrégation de la protéine Tau humaine mutée dans le modèle Tau KI sont évalués en biochimie et en immunohistochimie. D'autres troubles liés à la MA comme la perte synaptique et la neuroinflammation sont aussi évalués.

3.1 Anxiété et troubles de la mémoire spatiale à court terme

Si les modèles murins de Tauopathies peuvent parfois présenter des troubles importants de motricité ou de paralysie suite à l'expression des transgènes (Audouard et al., 2015), cela n'est pas observé pour le modèle Tau KI. L'analyse des déplacements lors du test en champ libre montre une locomotion normale et aucune différence d'anxiété chez le modèle Tau KI comparé aux contrôles (WT). Ainsi, sur un plan comportemental, les souris des 2 groupes ont tendance à explorer la zone la plus proche des murs représentés en gris et y passent 95% du temps du test plutôt que le centre de l'arène (**figure 37A**). Ces niveaux d'anxiété sont confirmés et vérifiés au moyen du test du labyrinthe en croix surélevé. Les souris des 2 groupes passant 95% du temps du test au niveau des bras fermés du labyrinthe, le test montre une anxiété élevée. Ces résultats sont contradictoires par rapport à l'anxiété accrue souvent observée dans les modèles transgéniques de Tauopathies. En effet le modèle THY-Tau22 du laboratoire par exemple montre un phénotype marqué par une déshinhibition comportementale et une hypoanxiété.

Nous avons ensuite étudié la mémoire spatiale des souris Tau KI. Les résultats montrent un trouble cognitif lié à la mémoire à court terme dans le test comportemental du labyrinthe en Y par

rapport aux contrôles. En effet, au bout d'une minute d'exploration en phase de test, les souris Tau KI passent autant de temps à explorer le bras ancien qu'à explorer le bras nouveau du labyrinthe (**figure 37B**). Ces résultats suggèrent une altération de la mémoire à court terme à l'âge de 16 mois pour le modèle Tau KI.

3.2 Expression du transgène en transcriptomique

Après sacrifice des souris et récupération des différents tissus d'intérêt, l'analyse transcriptionnelle de l'expression du transgène humain en qPCR a été vérifiée dans le système nerveux central (Cortex et hippocampe) et dans des tissus périphériques comme le cœur et le muscle en analyse transcriptionnelle en q-PCR (**figure 37C**). Les souris Tau KI expriment le transgène de la Tau humaine à un niveau ramené à 100% (rectangles rouges figure 37C). L'expression du gène *Mapt* murin a aussi vérifiée au niveau des souris WT dans les mêmes structures (**figure 37D**), les niveaux d'expression du gène *Mapt* est ramené à 100% dans les souris WT (rectangles gris figure 37D). Les souris Tau KI ne présentent pas d'ARNm correspondant au *Mapt* murin ce qui confirme qu'elles expriment uniquement le transgène humain (rectangles rouges figure 37D).

3.3 Expression et phosphorylation de Tau

L'hippocampe et le cortex étant des structures primo-affectées par les DNF, plusieurs anticorps ont été testés par Western blot pour détecter la protéine Tau (**figure 37E**). La protéine Tau humaine représentée par les étoiles bleues est spécifiquement détectée à 60kDa avec un anticorps anti-Tau en N-terminal (**Nter**) et un anticorps anti-V5 reconnaissant l'étiquette V5 intégrée dans la séquence du transgène inséré. La forme majoritaire de la protéine Tau de souris représentée par l'étoile rouge (**figure 37E**) est détectée à 50 kDa avec un anticorps anti-Tau en C-terminal (**Cter**) qui détecte également la protéine Tau humaine à 60kDa. Les niveaux d'expression de la protéine Tau humaine par rapport à la Tau murine suggère une diminution de l'expression de la Tau totale dans le modèle Tau KI.

Les niveaux de phosphorylation de la protéine Tau sont également évalués avec des anticorps Tau phospho-dépendants (**figure 37E**). Des anticorps dirigés contre certains sites de phosphorylation qui sont retrouvés anormalement ou hyperphosphorylés chez les patients atteints de MA tels que la sérine 396 (**pSer396**), 422 et 262 de Tau n'ont pas permis d'observer une différence de phosphorylation de la Tau humaine à cet âge. Afin de chercher des troubles plus subtils au niveau de la solubilité de Tau qui peut se traduire par un changement de conformation ou d'agrégation, un fractionnement biochimique a été réalisé. La fraction soluble S (S1+S2 en rectangles pleins **figure 37F**) contenant la Tau monomérique et la fraction insoluble (I en rectangles hachurés **figure 37F**) contenant les espèces de Tau insolubles ou agrégées sont analysées par Western Blot. Un anticorps anti-Tau en C-terminal (E13N) est utilisé et les fractions sont quantifiées par rapport

à la quantité de protéines Tau totale (montrée par une pointe rouge **figure 37F**) dans le modèle WT et dans le modèle Tau KI (**figure 37F**). De la même façon que pour l'analyse des phospho-épitopes de Tau, aucune différence n'est décelée entre le modèle Tau KI et les souris contrôles en termes de fraction insoluble. Il semblerait que la protéine Tau humaine mutée ne subit pas de changement de conformation ou d'agrégation.

3.4 Exploration synaptique et neuroinflammation

Afin d'expliquer les déficits cognitifs au niveau de la mémoire à court terme décelés par le test du labyrinthe en Y (**figure 37B**), une éventuelle perte synaptique a été évaluée à travers les niveaux d'expression de certaines protéines synaptiques telles que la protéine de densité synaptique **PSD95** et la protéine associée au synaptosome **SNAP25** en Western Blot (**figure 37E**). Ces analyses n'ont pas permis de mettre en évidence des différences d'expression de ces marqueurs synaptiques entre les souris Tau KI et les souris contrôles.

La neuroinflammation étant également une caractéristique des Tauopathies (Bellucci et al., 2004), plusieurs marqueurs comme la **GFAP** pour les astrocytes et le **CD68** (*Cluster of Differentiation 68*) pour la microglie sont retrouvés légèrement augmentés en qPCR (**figure 37G**), ceci est confirmé par une augmentation de l'expression de la GFAP en Western Blot (**figure 37E**) et en immunofluorescence dans l'hippocampe (**figure 37H**). La localisation de la Tau humaine et des astrocytes est observée par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-V5 (en vert **figure 37H**) et un anticorps anti-GFAP (en rouge **figure 37H**). La quantification du signal en immunofluorescence montre une augmentation non significative au niveau l'aire CA1 de l'hippocampe (**figure 37I**).

En conclusion, l'altération de la mémoire spatiale à court terme ainsi que les résultats obtenus avec les marqueurs inflammatoires en absence d'agrégation visible de la protéine Tau montrent une susceptibilité des souris Tau KI âgées de 16 mois à présenter des troubles précoces de Tauopathies.

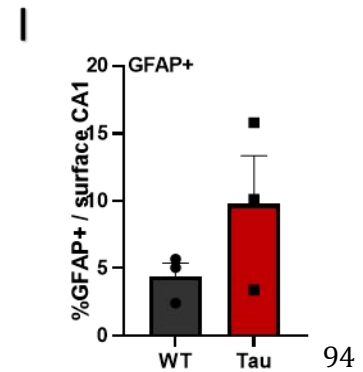
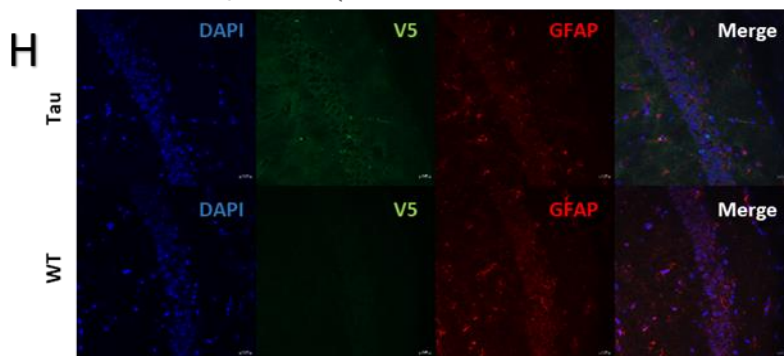
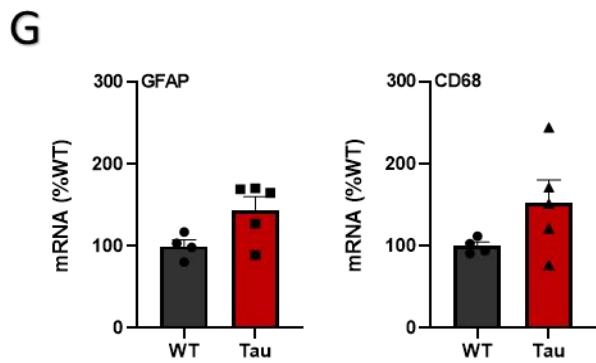
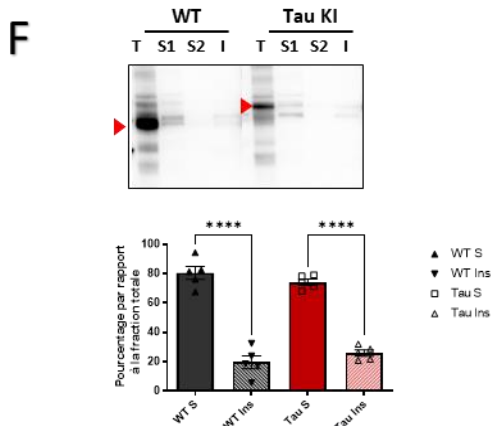
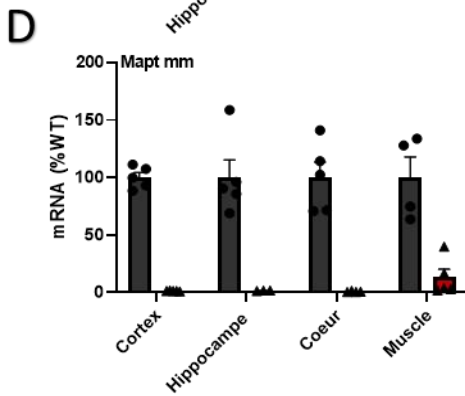
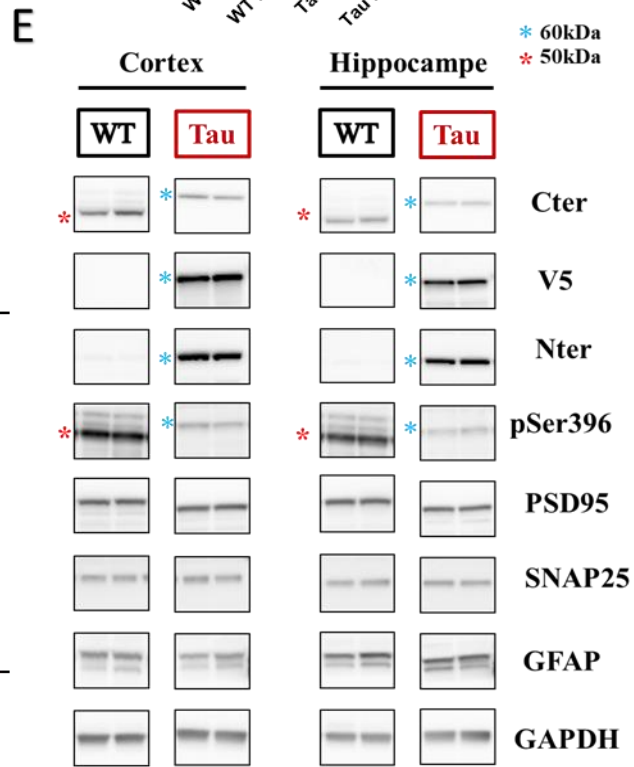
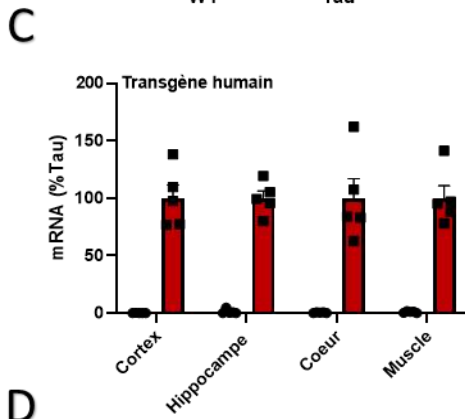
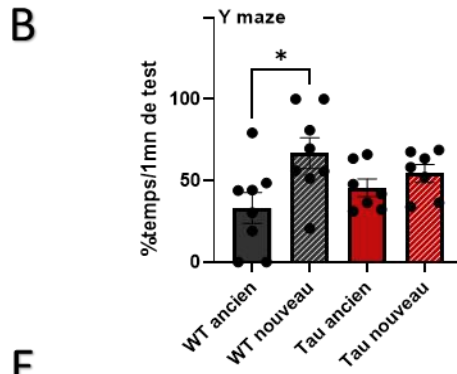
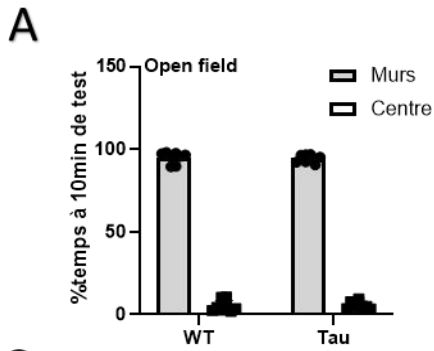


Figure 37 : L'expression de la protéine Tau 1N4R mutée P301L induit une altération de la mémoire à court terme et une neuroinflammation dans les souris Tau KI à l'âge de 16 mois.

(A) Durée d'exploration des murs (rectangles gris) et du centre de l'arène (rectangles blancs) au test du champ ouvert. (B) Résultats d'évaluation des troubles mnésiques par le test du labyrinthe en Y. Durée d'exploration du bras nouveau (rectangles pleins) et du bras ancien (rectangles hachurés) pour chaque groupe par rapport à la durée d'une minute du test. n=8 par groupe. Statistiques : One-way ANOVA. *p<0,05, ns p>0,05. (C) Expression du transgène humain et (D) du gène *Mapt* murin au niveau central par qPCR. Les Ct sont normalisés par rapport à la cyclophiline. (E) Western Blot mettant en évidence l'expression et la phosphorylation de la protéine Tau, les marqueurs synaptiques SNAP25 et PSD95 et inflammatoire GFAP. La forme majoritaire de la protéine Tau de souris est montrée par une étoile rouge avec l'anticorps Cter. La protéine Tau humaine est montrée par une étoile bleue avec l'anticorps V5 et Nter. L'anticorps pSer396 reconnaît Tau uniquement lorsque la Sérine 396 est phosphorylée. La GAPDH sert de témoin de charge. Masse moléculaire en kDa. (F) Western Blot représentatif avec l'anticorps E13N et quantification de la fraction Tau soluble S (S1 et S2) et la fraction insoluble I par rapport à la fraction totale (montrée par une pointe rouge). (G) Expression par qPCR de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) et de la classe de différenciation CD68 au niveau de l'hippocampe en pourcentage par rapport aux niveaux d'expression chez les WT (%WT). n=5 par groupe. (H) Immunohistofluorescence réalisée avec un anticorps anti-V5 qui reconnaît la protéine Tau humaine (en vert), un anticorps anti-GFAP (en rouge) et un marquage DAPI des noyaux (en bleu). La région présentée est la CA1. Echelle=20µm. (I) Quantification du signal GFAP en immunofluorescence au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe. n=3 par groupe. Statistiques : t-test non significatif. Les résultats sont exprimés en moy±sem.

Etude 2 : Induction d'une amyloïdose dans le modèle Tau KI

L'étude précédente sur le modèle Tau KI montre que ce modèle présente un phénotype métabolique qui suggère une perte de fonction à ce niveau en plus d'une altération de l'homéostasie du glucose sous un régime riche en graisse. De plus, ce modèle présente des troubles de la mémoire spatiale à court terme à l'âge de 16mois et une neuroinflammation sans agrégation de Tau. Afin de se rapprocher de ce qui se passe dans un cerveau atteint de MA et dans un but d'étudier l'effet du développement d'une pathologie amyloïde sur la progression de la pathologie Tau, nous avons croisé ce modèle Tau KI avec le modèle APP KI. Le but de ce croisement de pouvoir accélérer la pathologie Tau et l'apparition d'agrégats de Tau dans le modèle Tau KI par la présence d'une pathologie amyloïde chronique qui pourrait la précéder et la potentialiser. Cette étude a été menée sur deux cohortes de souris issues du croisement APP KI x Tau KI. Les analyses ont été réalisées à 6 mois dans un premier temps (**figure 38**) et à un âge plus avancé de 12 mois (**figure 39**) dans le but de suivre la progression de la pathologie amyloïde et Tau et évaluer les interactions possibles entre les protéines humaines A β et Tau sans surexpression dans le modèle double mutant APPxTau résultant de ces croisements.

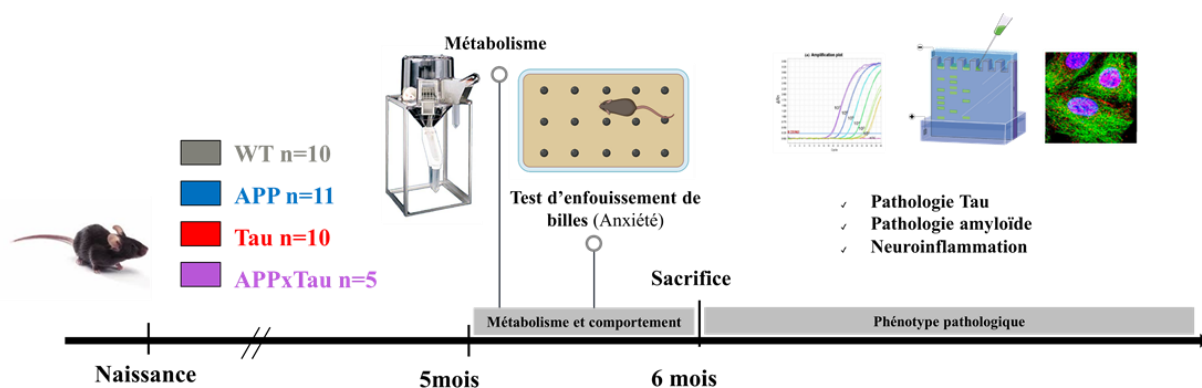


Figure 38 : Schéma illustrant les analyses effectuées sur le premier lot de souris double transgéniques à l'âge de 6mois.

Un mois avant le sacrifice, les souris sont évaluées en cages métaboliques puis en test de comportement d'enfouissement de billes pour évaluer les niveaux d'anxiété. Les souris sont sacrifiées à l'âge de 6 mois pour évaluer l'état de la pathologie et ces différents aspects moyennant différentes techniques.

Comme les troubles cognitifs apparaissent avec l'âge, une batterie de tests de comportement a été utilisé pour évaluer différents paramètres cognitifs à 12mois (**figure 39**) En plus des croisements, nous avons également procédé à l'inoculation hippocampique de souris Tau KI par des lysats de

cerveaux APP KI afin d'évaluer la capacité de cette exposition à accélérer la pathologie Tau et induire l'agrégation de la protéine Tau humaine mutée.

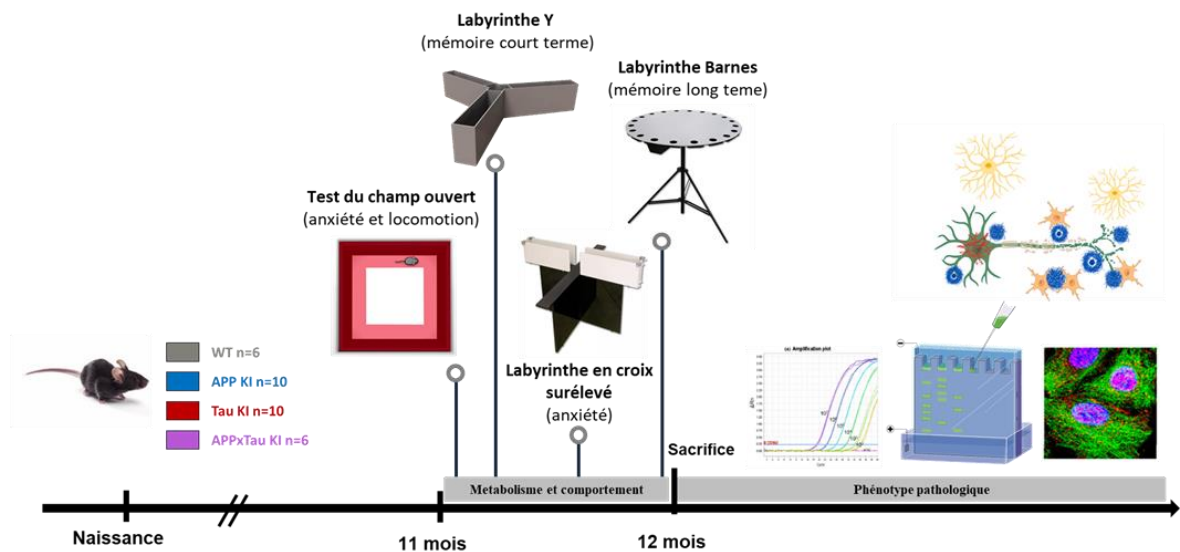


Figure 39 : Schéma illustrant les tests de comportement réalisés sur le deuxième lot de souris double transgéniques à l'âge de 12 mois.

Un mois avant le sacrifice, plusieurs tests de comportement ont été réalisés (Actimétrie, Y-Maze, Labyrinthe en croix surélevé et le test de Barnes) afin d'évaluer les niveaux d'anxiété ainsi que la mémoire à court et long terme. Les souris sont sacrifiées à l'âge de 12 mois pour être analysées en transcriptomique, en biochimie et en immunohistochimie.

1 Analyse de la pathologie amyloïde en post-mortem

L'expression de l'APP et du peptide amyloïde est évaluée en transcriptomique et en biochimie. L'expression de l'APP est comparable en qPCR entre les souris APP et les APPxTau. Des anticorps dirigés contre la région C-terminale de l'APP (anticorps APP C17) et contre le peptide amyloïde A β (6E10) ont été utilisés en Western Blot pour révéler l'expression protéique des 2 protéines à 6 et 12 mois. L'APP est observé vers 100kDa. Le peptide amyloïde lui est observé à 4kDa (**figure 46D**). Les immunoempreintes montrent une expression de l'APP équivalente dans les différents groupes. L'APP n'est donc effectivement pas surexprimé chez les modèles humanisés pour A β . Ce dernier est exprimé à des niveaux supérieurs dans les modèles APP KI et APPxTau par rapport aux souris WT et Tau KI, c'est pour cette raison qu'on visualise la bande A β uniquement dans les groupes APP et APPxTau.

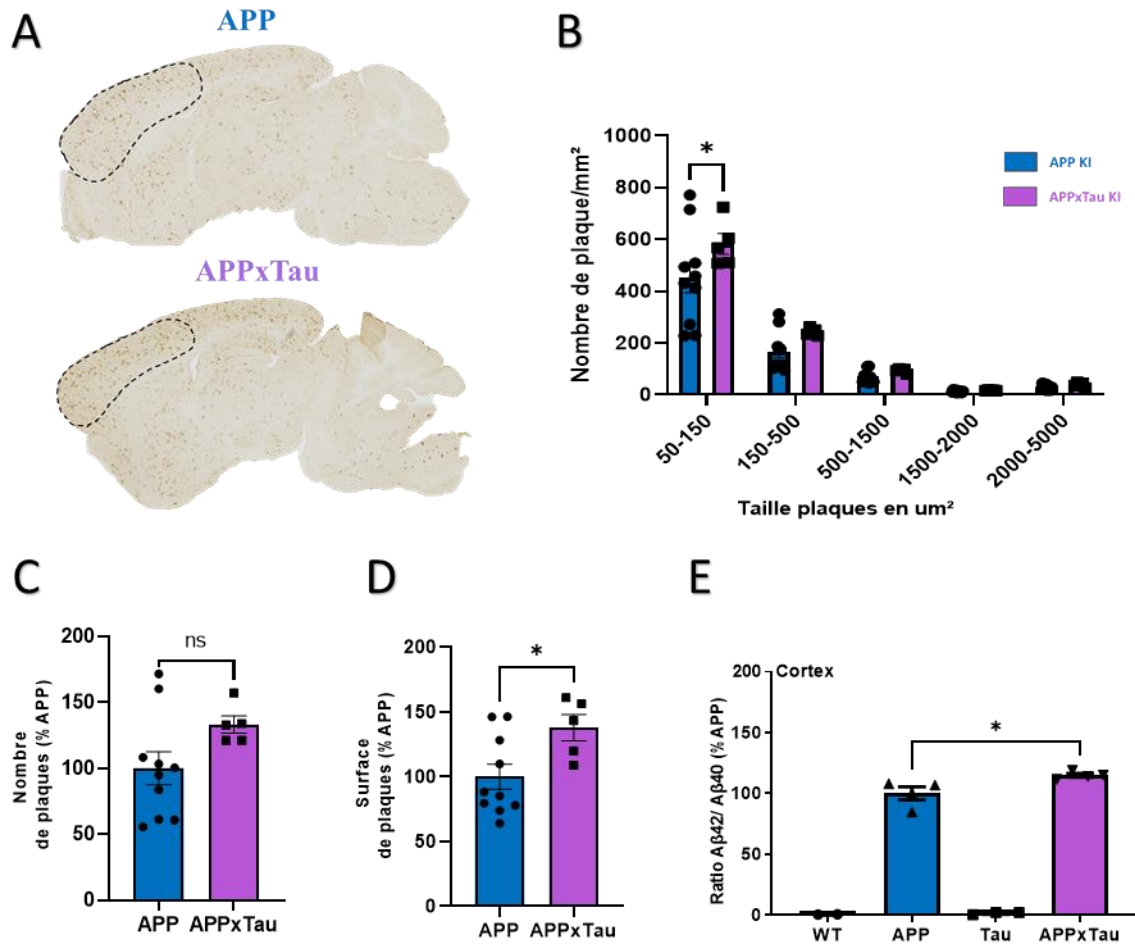


Figure 40 : Augmentation de l'agrégation des peptides amyloïdes et de la production d'Aβ42 dans le modèle APPxTau à 6 mois.

(A) Représentation du marquage de l'anticorps 6E10 en immunohistochimie au niveau de coupes sagittales de cerveaux de souris APP et APPxTau. (B) Distribution des plaques amyloïdes par mm² selon leur taille allant de 50 à 5000µm² au niveau du cortex frontal. (C) Quantification par rapport aux APP KI du nombre de plaques amyloïdes avec l'anticorps 6E10 au niveau du cortex frontal. (D) Augmentation de la surface des plaques amyloïdes par rapport aux APP KI au niveau du cortex frontal. Statistiques : (B) Two-way ANOVA, (C-D) t-test *p<0,05, ns p>0,05. n≥5 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy±sem. à partir de 4 tranches de cerveau minimum par animal. (E) Ratio Aβ42/Aβ40 par quantification ELISA des niveaux d'expression de Aβ40 et Aβ42 en test ELISA (Invitrogen) dans le cortex dans des souris femelles à 6 mois. Statistiques : One-way ANOVA *p<0,05, ns p>0,05. n≥4 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy±sem.

L'anticorps 6E10 dirigé contre Aβ a été utilisé en immunohistochimie pour marquer les plaques amyloïdes qui sont le résultat de l'agrégation extracellulaire du peptide amyloïde. Si le modèle Tau KI ne présente pas de plaques amyloïdes, le modèle double transgénique développe des plaques de façon comparable aux souris APP KI. Ainsi, le nombre de plaques et la surface marquée ont été quantifiés au niveau du cortex et de l'hippocampe. Ces deux paramètres sont augmentés dans les souris APPxTau par rapport aux souris APP au niveau du cortex frontal (**figure 40A et 41A**) de manière significative à 6 mois (**figure 40C-D**) et de manière non significative à 12 mois

(figure 41C-D). De façon intéressante, la distribution des plaques est examinée en détail en termes de taille, cette augmentation est toujours observée et est significative au niveau des plaques A β de petite taille, inférieure à 150 μm^2 à 6 mois (figure 40B) et à 12 mois (figure 41B).

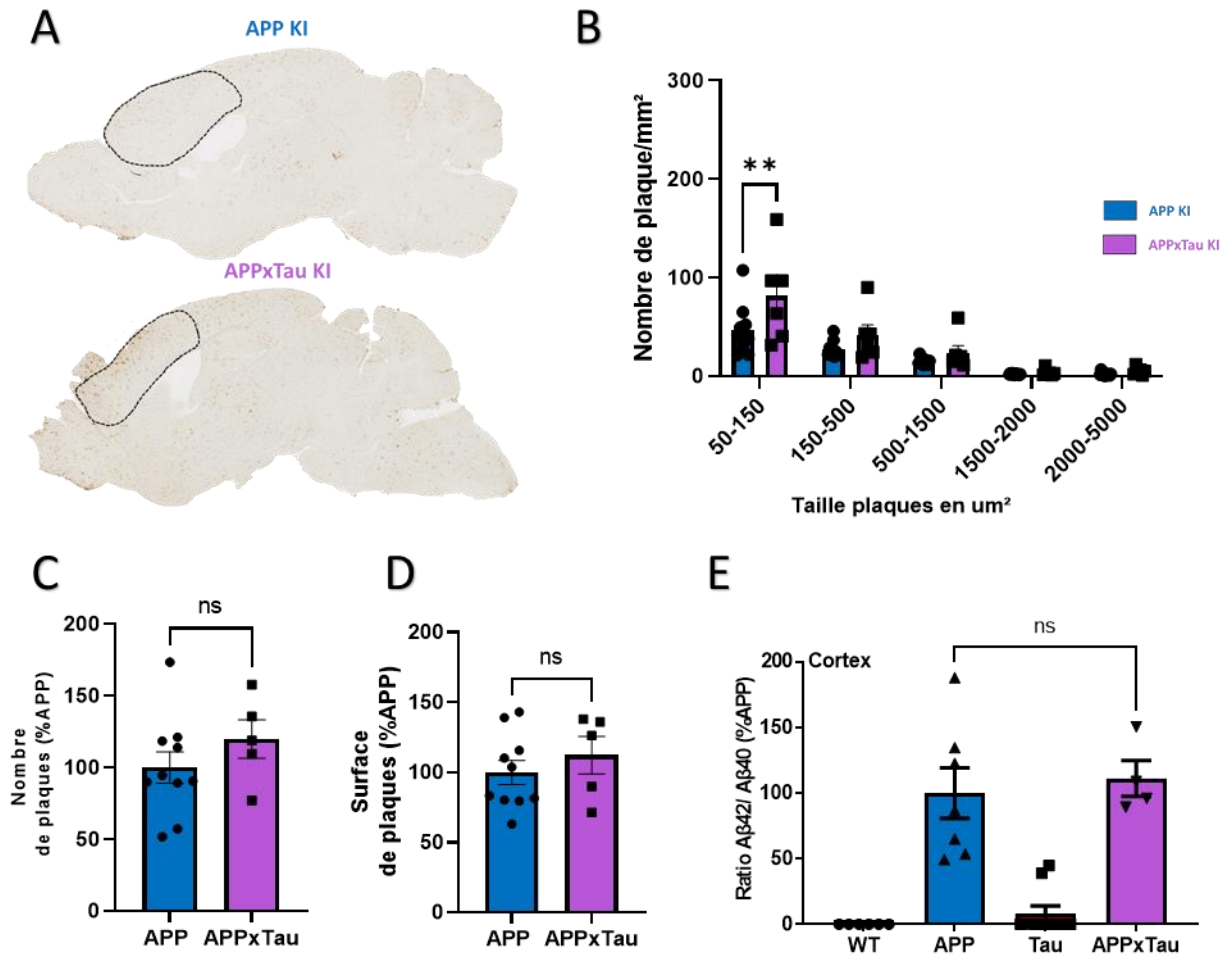


Figure 41 : Analyse de la production et de l'agrégation des peptides amyloïdes dans le modèle APPxTau à 12mois.

(A) Représentation du marquage de l'anticorps 6E10 en immunohistochimie au niveau de coupes sagittales de cerveaux de souris APP et APPxTau. (B) Distribution des plaques amyloïdes par mm^2 selon leur taille allant de 50 à 5000 μm^2 au niveau du cortex frontal. (C) Quantification par rapport aux souris APP du nombre de plaques amyloïdes avec l'anticorps 6E10 au niveau du cortex frontal. (D) Quantification de la surface des plaques amyloïdes par rapport aux APP Ki au niveau du cortex frontal. Statistiques : (B) Two-way ANOVA, (C-D) t-test * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$. $n \geq 5$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem à partir de 4 tranches de cerveau minimum par animal. (E) Ratio A β 42/A β 40 par quantification ELISA des niveaux d'expression de A β 40 et A β 42 en test ELISA (Invitrogen) dans le cortex chez les femelles. Statistiques : One-way ANOVA * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$. $n \geq 5$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

Afin de vérifier si l'augmentation du nombre de plaques est liée à une augmentation de la quantité d'A β dans le cerveau ou à une modification de la différence de ratio A β 42/A β 40 qui peuvent

expliquer ces différences, les taux d'expression de A β 40 et A β 42 ont été dosés dans les homogénats de cerveaux en utilisant un test ELISA (Invitrogen). Le ratio A β 42/A β 40, exprimé en pourcentage par rapport aux niveaux d'expression dans les souris APP, confirme bien l'augmentation de l'isoforme A β 42 du fait des mutations introduites au niveau du gène de l'APP dans les souris APP et APPxTau. Une différence significative est observée au niveau du ratio A β 42/A β 40 à 6mois (**figure 40E**). L'augmentation du ratio A β 42/A β 40 dans le modèle APPxTau par rapport au modèle APP pourrait expliquer l'augmentation du nombre de plaques au niveau du cortex frontal à 6mois, l'isoforme A β 42 étant propice à l'agrégation. A 12mois, aucune différence n'est détectée entre ces deux groupe (**figure 41E**).

2 Effet de la β -amyloïdose sur le phénotype pathologique du modèle Tau KI

2.1 Au niveau métabolique

Les modèles murins de MA développent souvent un phénotype diabétique et des altérations métaboliques conséquentes (Vandal et al., 2015). La voie de signalisation de l'insuline ainsi que le métabolisme du glucose jouent par conséquent un rôle important dans le développement de la pathologie et peuvent même déclencher l'accumulation d'A β , la phosphorylation de Tau ou les processus de neuroinflammation qui contribuent à la neurodégénérescence. Une résistance persistante à l'insuline expose les cellules β pancréatiques à un excès de glucose et de lipides qui conduit à leur dysfonctionnement. L'accumulation d'A β dans le pancréas est également une caractéristique du diabète de type 2. Les peptides amyloïdes sont ainsi impliqués dans le développement de résistance à l'insuline dans la MA du fait qu'ils provoqueraient une internalisation des récepteurs à l'insuline, en particulier médiée par le développement d'une inflammation (Zhao et al., 2008; De Felice, 2013).

Les rôles de Tau et A β en périphérie sont de plus en plus investigués, particulièrement leur rôle dans le fonctionnement des cellules β pancréatiques et dans la résistance à l'insuline périphérique. En effet, A β peut se lier à différents récepteurs en périphérie, son expression au niveau du pancréas, du foie et du muscle suggère son implication dans l'induction des troubles de l'homéostasie du glucose et d'insulino-résistance (Roher et al., 2009).

La protéine Tau s'exprime aussi au niveau périphérique dans des tissus comme le muscle, le cœur, le rein (Gu et al., 2002). Une hyperphosphorylation de Tau est aussi retrouvée au niveau du pancréas de patients atteints de DT2 (Miklossy et al. 2010). Les travaux du laboratoire ayant montré le rôle de Tau dans le contrôle de l'homéostasie énergétique périphérique (Marciniak et al., 2017) ont été répliqués par d'autres (Wijesekara et al., 2018a).

Ainsi, la présence de Tau et A β dans les tissus périphériques et au niveau du pancréas constitue un lien potentiel entre la MA et les altérations du métabolisme.

Afin d'évaluer d'éventuels changements métaboliques qui pourraient être reliés à l'expression des transgènes humains dans le modèle APPxTau, celui-ci ainsi que leurs contrôles (simple mutants et sauvages) ont été suivis en cages métaboliques à 6 mois. Le suivi de la consommation d'oxygène, les rejets de gaz carbonique, l'activité motrice spontanée et la prise alimentaire en continu sur 24h ont permis de comparer le coefficient respiratoire ainsi que les dépenses et la balance énergétique et d'autres paramètres.

L'exploration de la composition corporelle par tomodynamométrie a montré que les souris Tau présentent une augmentation de la masse corporelle (**figure 42A**) associée à une augmentation de la masse maigre (**figure 42B**) et grasse (**figure 42C**) par rapport aux contrôles WT. Ce gain de poids est associé chez les souris Tau à une hyperphagie nocturne. Lorsque le poids est normalisé par rapport à la masse maigre, il n'y a plus de différences significatives.

Les souris APP présentent une tendance à l'augmentation de la masse corporelle ($p=0.0863$) associée à une augmentation significative de la masse maigre (**figure 42B**) sans différence au niveau de la masse grasse par rapport aux WT (**figure 42C**).

Au niveau du profil métabolique, les souris APP sont très similaires aux WT sauf pour l'activité locomotrice qui est significativement augmentée la nuit (**figure 42F**) sans différence de la balance énergétique (**figure 42G**) par rapport aux autres groupes.

Les souris APPxTau quant à elles ont moins de masse grasse par rapport aux souris Tau (**figure 42C**). Le profil métabolique sans normalisation par la masse maigre uniquement montre une hyperphagie nocturne (**figure 42E**) associée à une balance énergétique plus excédentaire la nuit (**figure 42G**).

Des mesures de glycémie ont aussi été effectuées le matin sans mise à jeun des souris (**figure 42H**). Il n'y a pas de différence de glycémie entre les différents groupes ce qui voudrait dire que les souris ne présentent *a priori* pas de troubles de l'homéostasie glucidique (à confirmer par des mesures d'insulinémie).

Finalement, ces groupes sont très hétérogènes notamment en termes de composition corporelle ce qui rend l'analyse difficile. Il est tout de même intéressant de voir que le phénotype APP apporte une amélioration au niveau de la masse grasse qui augmente chez les souris Tau mais n'affecte pas l'activité locomotrice ni la balance énergétique (avec normalisation par rapport à la masse grasse).

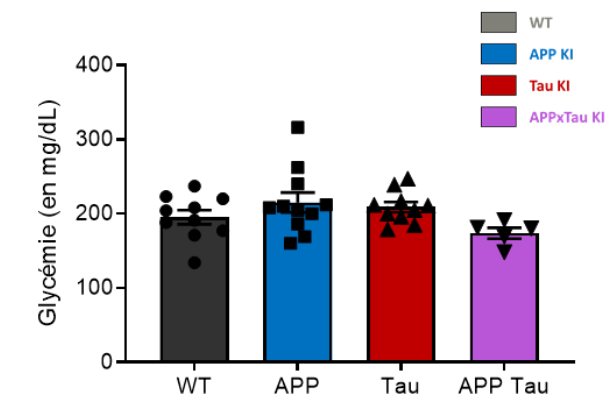
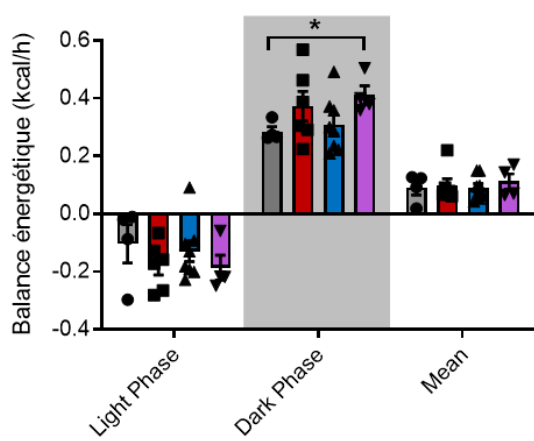
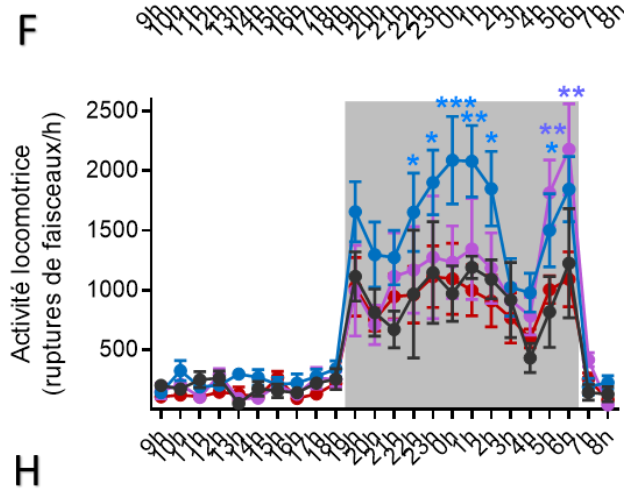
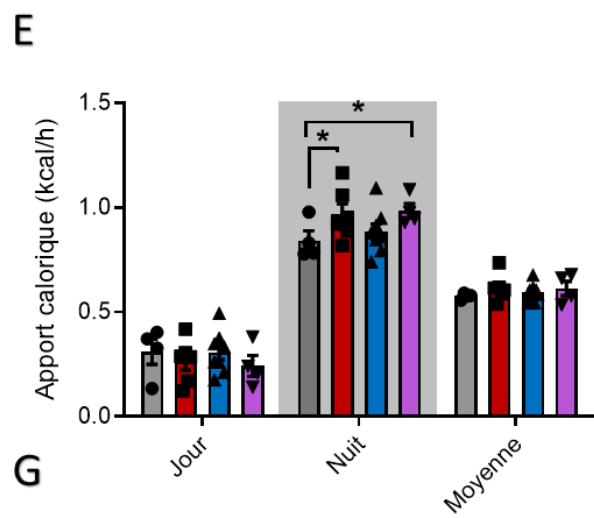
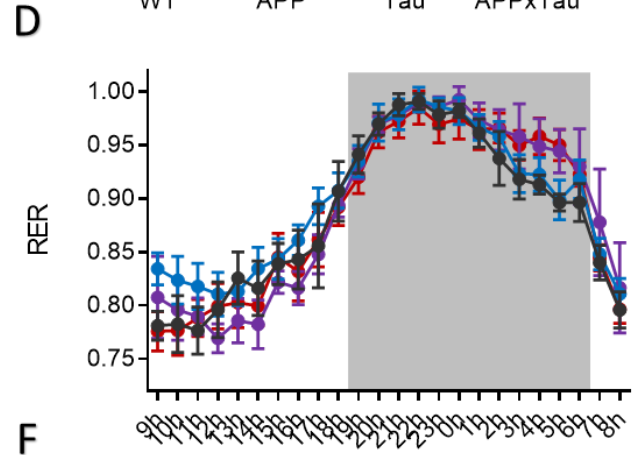
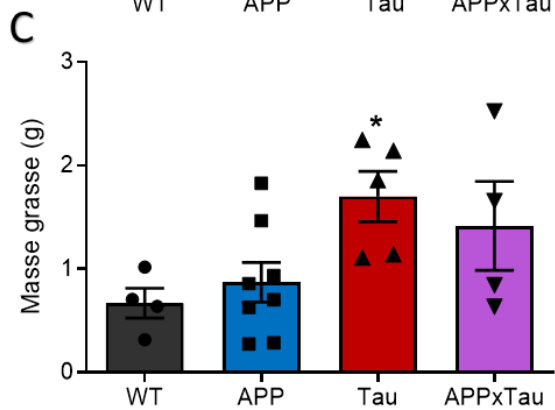
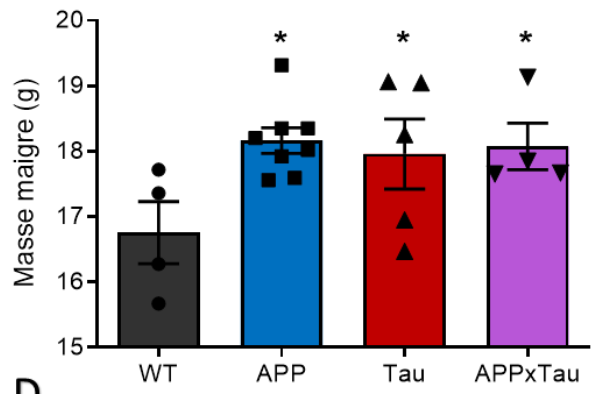
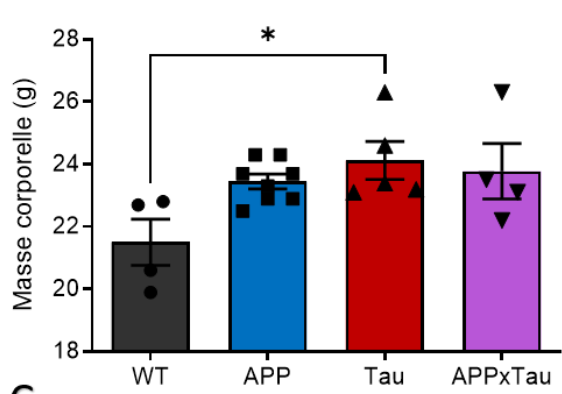


Figure 42 : Analyses métaboliques du modèle APPxTau et des groupes contrôles.

(A) Mesure de la masse corporelle générale en grammes. (B) Mesure de la masse maigre en grammes. (C) Mesure de la masse grasse en grammes. (D) Mesure du quotient respiratoire (RER). (E) Mesure de l'apport calorifique en kcal. (F) Mesure de l'activité ambulatoire par rupture des faisceaux laser dans les cages métaboliques par heure. (G) Bilan énergétique ramené en kcal/h. La phase de jour est en blanc (12h) et la phase de nuit est en gris (12h). (H) Mesure de la glycémie chez les mâles et les femelles en milligrammes par décilitres. $n \geq 4$ femelles par groupe Statistiques : one-way ANOVA et two-way ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

2.2 Au niveau comportemental

A 6 mois, un test d'enfouissement de billes a été réalisé afin d'évaluer l'anxiété et le comportement compulsif des souris. La cage et les billes formant un milieu inconnu et anxiogène pour les souris, celles à caractère plus anxieux vont enfouir plus de billes (**figure 43A**). Ce test a montré que les souris Tau et APPxTau ont tendance à enfouir moins de billes par rapport aux souris APP et WT ce qui suggère un niveau d'anxiété légèrement moins élevé (**figure 43A**). Ce test montre une grande variabilité au sein du même groupe. Les différences observées ne sont, de ce fait, pas significatives.

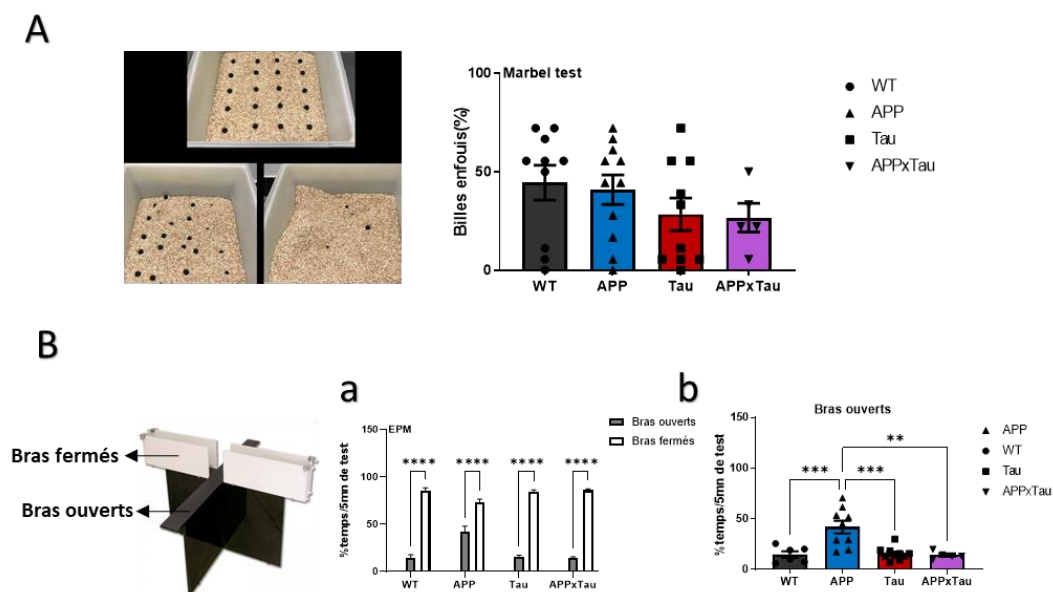


Figure 43 : Niveaux d'anxiété évalués du modèle APPxTau à 6 et 12 mois.

(A) Niveaux d'anxiété évalués en test d'enfouissement de billes à 6 mois. L'image montre la disposition des billes dans la cage en haut, une proportion élevée de billes enfouies en bas à droite due au passage d'un animal anxieux et une proportion faible de billes enfouies par les souris en bas à gauche due au passage d'un animal moins anxieux. Le pourcentage de billes enfouies au 2/3 au minimum à la fin du test est représenté par groupe. Statistiques : One-way ANOVA non significatif. (B) Niveaux d'anxiété évalués par le test du labyrinthe en croix surélevé à 12 mois. (a) Le pourcentage de temps passé dans les bras fermés (rectangles vides) et dans les bras ouverts (rectangles gris) sont exprimés par rapport à la durée totale de 5mn du test. Two-way ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. n (b) Le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts uniquement est représenté par groupe. Statistiques : One-way ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. $n \geq 5$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

Une fois l'absence de troubles locomoteurs vérifiée, le niveau d'anxiété des souris a aussi été évalué à 12 mois au moyen du labyrinthe en croix surélevé. Les souris des 4 groupes passent plus de 70% du temps du test au niveau des bras fermés du labyrinthe (**figure 43B-a**). L'expression des deux protéines à des niveaux physiologiques ne semble pas modifier le niveau d'anxiété des souris APPxTau, qui est à un niveau similaire aux souris Tau et WT. En revanche, les souris APP passent significativement moins de temps que les autres groupes au niveau des bras fermés (**figure 43B-b**) ce qui montre une désinhibition qui serait due à la pathologie amyloïde. Il semblerait que dans le modèle APPxTau, le phénotype anxieux du groupe Tau l'emporte sur le caractère désinhibé des souris APP.

La mémoire à court et long terme a été évaluée à 12 mois afin de détecter d'éventuels déficits mnésiques dans le modèle APPxTau comparé aux simples mutants. Une altération de la mémoire à court et long terme ont été documentées auparavant dans le modèle APP^{NL-G-F} grâce au test du labyrinthe en Y et le test de la piscine de Morris (Saito et al., 2014; Mehla et al., 2019).

Le test du labyrinthe en Y a été réalisé pour tester la mémoire spatiale à court terme. Les souris WT sont utilisées comme contrôles car celles-ci, ne présentant pas d'altération de la mémoire à court terme, passent plus de temps à explorer le bras nouveau par rapport aux autres bras (**figure 44A**). Les souris APP et APPxTau ne font pas la différence entre le bras nouveau et le bras qu'elles ont déjà exploré en phase d'apprentissage à 2min du test (**figure 44B et D**). Ceci suggère une

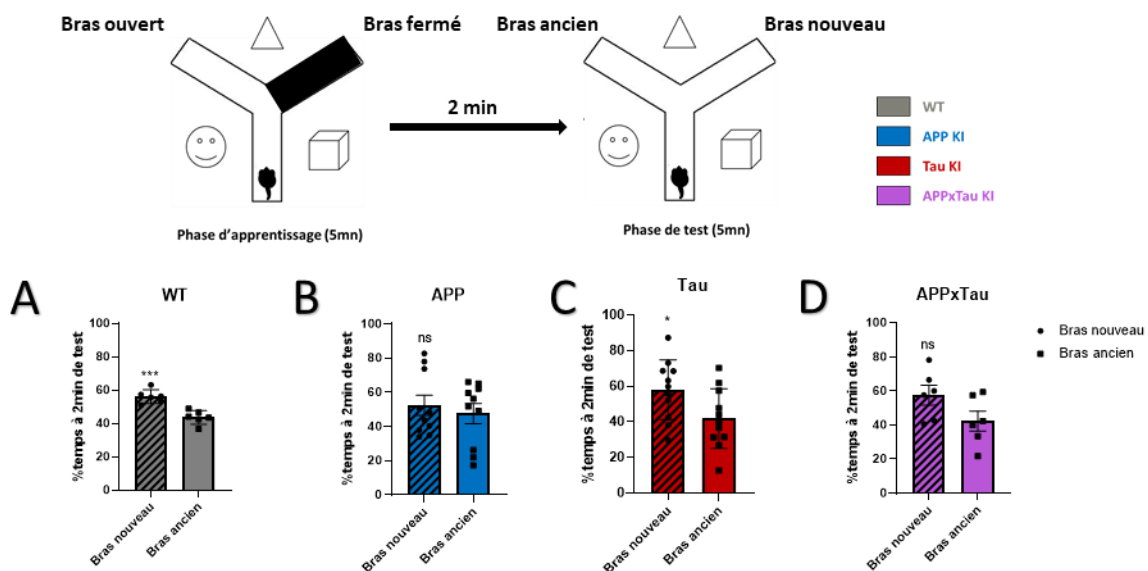


Figure 44 : Altération de la mémoire à court terme dans le modèle APPxTau à 12 mois.

Le temps passé dans le bras nouveau (en hachuré) ainsi que le temps passé dans le bras ancien (rectangle plein) sont représentés par rapport à 2mn du test dans chaque groupe. Statistiques : t-test *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns p>0,05. n≥5 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy±sem.

altération de la mémoire à court terme dans le modèle APPxTau. Ces dernières se rapprochent du modèle APP au niveau du phénotype comportemental décrit dans certaines études (Mehla et al., 2019). Le groupe Tau passe plus de temps dans le bras nouveau que le bras ancien (**figure 44C**).

La mémoire à long terme a été évaluée ensuite par le test du labyrinthe de Barnes où la souris doit apprendre à localiser et trouver une boîte d'échappement dans un des 40 trous du labyrinthe circulaire à l'aide de repères spatiaux. Au bout de 4 jours d'apprentissage, les souris des différents groupes retrouvent le trou cible de plus en plus rapidement ce qui valide la phase d'apprentissage du test (**figure 45A-B**). Le groupe APP reste le groupe le moins performant des 4 groupes en termes de latence primaire (temps nécessaire pour trouver le trou cible) (**figure 45A**) et de latence totale (temps nécessaire pour rentrer dans la boîte d'échappement) (**figure 45B**).

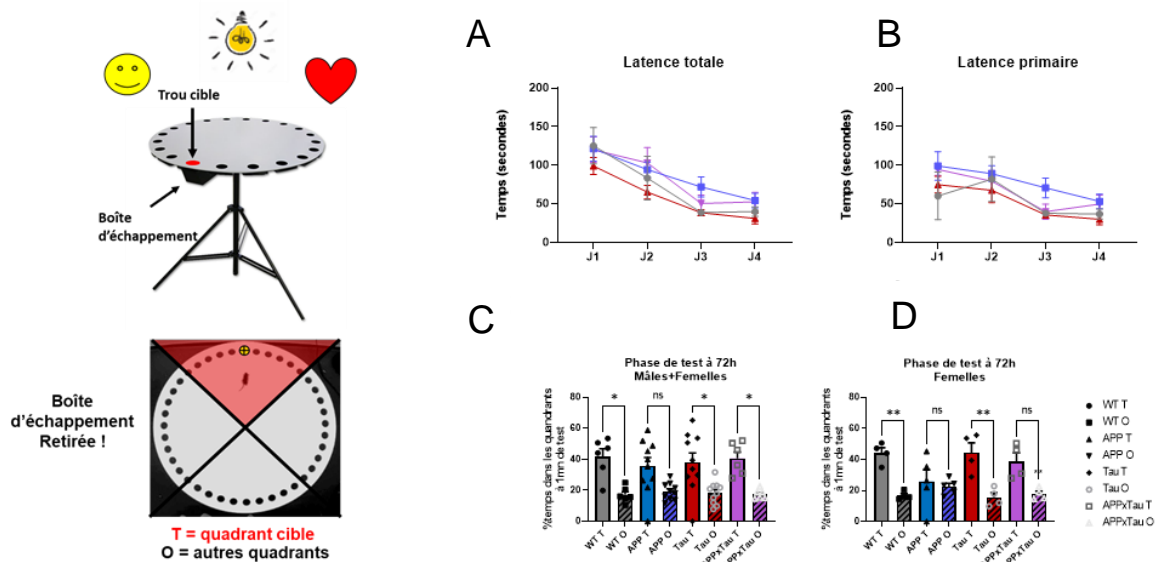


Figure 45 : Altération de la mémoire à long terme chez les femelles au niveau du test du labyrinthe de Barnes à 12mois.

L'apprentissage des souris est représenté par (A) la latence primaire qui est le temps mis pour retrouver la boîte d'échappement pour la première fois et (B) la latence totale qui représente le temps mis par la souris pour se réfugier dedans. Le temps passé dans le quadrant cible et dans les autres quadrants est représenté pour chaque groupe après un délai de rétention à 72h dans les souris mâles et femelles en (C) et dans les souris femelles uniquement en (D). Le temps passé dans le quadrant cible « T » est représenté par un rectangle plein et les autres quadrants « O » par un rectangle hachuré. Statistiques : One-way ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. $n > 5$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

Lors de la phase de test effectuée 72h après la phase d'apprentissage, les souris mâles et femelles du groupe WT ainsi que les souris Tau et APPxTau passent plus de temps dans les quadrants non-cible par rapport au quadrant cible où se trouvait la boîte d'échappement pendant la phase d'apprentissage. Les souris APP ne font pas la différence entre les deux (**figure 45C**). Nous avons

analysé séparément les résultats du test à 72h pour les femelles (**figure 45D**). Les femelles APP et APPxTau ne passent pas plus de temps dans leur quadrant cible (**figure 45D**). Une altération de la mémoire à long terme chez le groupe APP et APPxTau est donc observée ce qui suggère la dominance du phénotype APP par rapport aux souris Tau. Les résultats obtenus pour les APP sont concordants avec la littérature dans laquelle une altération de la mémoire à long terme a déjà été démontrée notamment avec le test de la piscine de Morris (Mehla et al. 2019). Si l'hippocampe constitue le lieu d'encodage de l'information, le cortex constitue le lieu de stockage des souvenirs qui est dans ce cas l'emplacement de la boîte d'échappement. Ces résultats suggèrent ainsi une altération au niveau de l'encodage et de la consolidation de l'information à long terme chez les femelles APP et APPxTau.

2.3 *Au niveau de l'expression de Tau*

Des analyses transcriptomiques (en qPCR) et biochimique (en Western Blot) ont été réalisées dans les 2 régions du cerveau généralement les plus affectées sur le plan neuropathologique (cortex et hippocampe) afin de visualiser l'expression de la Tau murine dans les souris contrôles et de valider l'expression de la Tau humaine mutée dans le modèle APPxTau. L'expression des transgènes humains APP (**figure 46A**) et Tau (**figure 46A**) est validée en qPCR. Les souris APP et APPxTau expriment de la même façon le transgène APP (**figure 46A**). De plus, une expression similaire du transgène Tau humain est confirmée chez les souris Tau et APPxTau (**figure 46B**).

L'expression de la Tau humaine mutée dans des tissus périphériques comme le cœur et muscle est observée en Western Blot avec l'anticorps anti-V5 dans le modèle Tau et APPxTau (**figure 46C**). De la même façon, plusieurs anticorps indépendants de l'état de phosphorylation de Tau ont été utilisés pour visualiser Tau dans le cortex et l'hippocampe en Western Blot à 6 et à 12 mois. Pour l'anticorps anti-Tau **Cter**, deux bandes majeures sont visibles : une bande à 50kDa qui correspond à l'isoforme majoritaire de la Tau murine chez les souris contrôles WT et les APP ; une bande à 60kDa qui correspond à l'isoforme de Tau humaine chez les Tau et les APPxTau (**figure 46D**). Des anticorps dirigés contre la région C-terminale de l'APP (anticorps **APP C17**) et contre le peptide amyloïde **A β** (**6E10**). L'APP est observé vers 100kDa et A β est observé à 4kDa (**figure 46D**). Le signal obtenu en Western Blot avec l'anticorps anti-Tau Cter suggère, comme il a déjà été démontré chez le modèle Tau KI à 16 mois, une diminution d'expression de la Tau humaine dans le modèle Tau et APPxTau en comparaison à l'expression de la Tau murine totale chez les souris contrôles. Ces résultats ont été confirmés par des tests ELISA « maison » qui détectent la Tau totale ainsi que la Tau humaine. En ELISA de Tau totale, une grande diminution des niveaux d'expression est observée entre les groupes APP et WT qui expriment une protéine Tau de souris et les groupes Tau et APPxTau qui expriment la protéine Tau humaine mutée dans le cortex et l'hippocampe

(figure 46E-E'). Ces résultats sont observés à 6 et à 12 mois. L'ELISA spécifique de la protéine Tau humaine ne révèle pas de différence d'expression de la protéine Tau humaine entre les groupes Tau et APPxTau dans le cortex et l'hippocampe **(figure 46F-F')**.

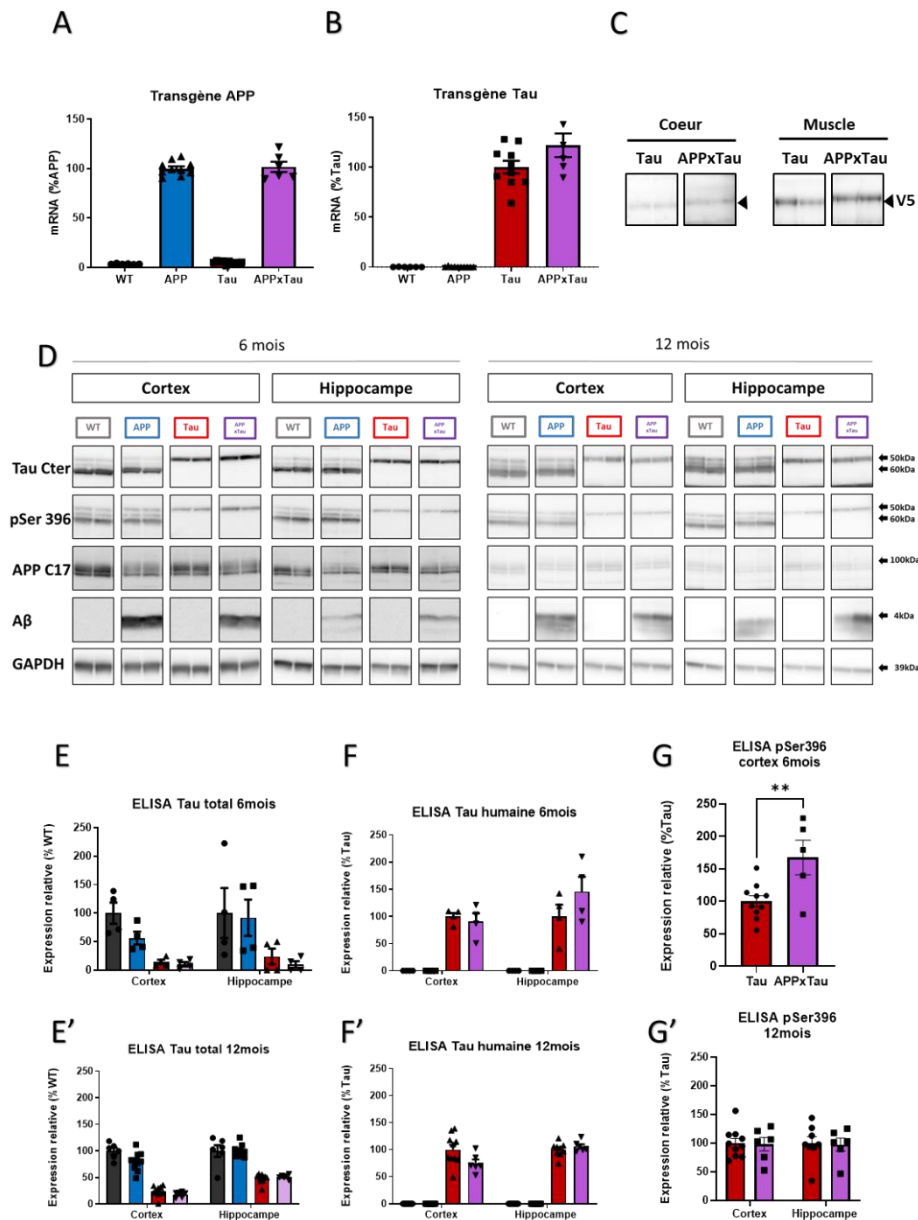


Figure 46 : Effet de l'amyloïdose sur l'expression de Tau et sa phosphorylation dans le modèle APPxTau.

(A) Expression relative de l'APP humanisé pour l'Aβ dans les souris APPxTau par rapport au taux d'expression chez les souris APP en qPCR au niveau du cortex. (B) Expression relative du transgène Tau par rapport au taux d'expression chez les souris Tau KI en qPCR au niveau du cortex. (C) Western Blot représentatif de la protéine Tau humaine marquée avec un anticorps anti-V5 dans le cœur et le muscle des souris Tau et APPxTau. (D) Immunoempreinte mettant en évidence l'expression de l'APP avec l'anticorps APP C17, Aβ avec l'anticorps 6E10 dans le cortex et l'hippocampe à 6 et 12 mois. Expression de la Tau humaine et de la tau murine avec l'anticorps TauCter et l'anticorps dirigé contre le site de phosphorylation potentielle Ser396 (pSer396) dans le cortex et l'hippocampe. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge. Masse moléculaire en kDa. Expression relative de la Tau humaine et totale en ELISA au niveau du cortex et de l'hippocampe à 6 (E-F) et 12 mois (E'-F'). Expression de la Tau humaine phosphorylée en Ser396 en ELISA au niveau du cortex à 6 (G) et dans l'hippocampe à 12 mois (G'). Statistiques : Two-way ANOVA *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, ns p>0,05. n≥4 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy±sem.

2.4 *Au niveau de la phosphorylation de Tau*

Il existe de 80 sites de phosphorylation potentiels de Tau (Sergeant et al., 2008). Il était intéressant de vérifier l'état de phosphorylation de certains sites qui sont retrouvés hyper ou anormalement phosphorylés dans le cerveau de patients atteints de MA. L'expression de la Tau humaine mutée étant la même au niveau des souris Tau et APPxTau (**figure 47C**), certains anticorps dirigés contre des phospho-épitotes comme la Ser396, 404 (**figure 47A**) sont testés en Western Blot pour comparer le profil de phosphorylation à 6 et 12 mois. La quantification du signal pSer396, pSer404 (**figure 47G**) et AD2 (pSer396/404) (**figure 47D**) montrent une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau humaine dans APPxTau à l'âge de 6 mois par rapport aux souris simples mutantes Tau (en hachuré) mais pas à l'âge de 12 mois entre les deux groupes (Rectangles pleins). Une hyperphosphorylation au niveau de Sérine 396 dans le groupe APPxTau comparé au groupe Tau est aussi observée et confirmée par un test ELISA de phospho-Tau humaine en Ser396 au niveau du cortex à 6 mois dans des souris femelles (**figure 46F**). Aucune différence n'est observée entre les deux groupes pour le site de la Ser396 en ELISA à 12 mois (**figure 46F'**). L'anticorps Tau1 qui cible des sites de déphosphorylation sur la Sérine 195, 198, 199 et 2020 montre une augmentation de la déphosphorylation sur ces sites entre le groupe Tau à 6 mois et le groupe Tau à 12 mois (**figure 47F**). D'autres phospho-épitopes ont été testés sur les cohortes à 6 mois ou à 12 mois comme la Ser262, 199 et 422 en Western Blot. De plus, des tests ELISA ciblant la phosphorylation pathologique au niveau de la Ser422 ainsi que la phosphorylation au niveau de la Ser396/404 (AD2) ont été réalisés mais n'ont pas pu être évalués compte tenu du faible seuil de détection de la variation dans nos modèles par rapport à des modèles de surexpression utilisés comme témoins positifs.

Cependant, le profil global de phosphorylation de Tau réalisé par électrophorèse bidimensionnelle (2D) montre un profil de migration de la protéine Tau humaine davantage orienté vers la région acide chez les APPxTau par rapport aux Tau à 6 et 12 mois (**figure 47B**). Ceci suggère une augmentation globale de l'état de phosphorylation de la Tau dans le modèle APPxTau. Les sites de phosphorylation et de déphosphorylation tels que pSer396, AD2 (pSer396/404), AT8 (Ser202/Thr305) et Tau1 (Ser195, 198, 199, et 202) ou encore des épitopes conformationnels (aa 7-9 et aa313-322) reconnus par l'anticorps MC1 ont aussi été testés en immunofluorescence. Aucune malconformation ou agrégation de Tau n'a pu être mise en évidence dans nos modèles. De plus, l'analyse du marquage Tau1 et pSer396 était difficile du fait du niveau d'expression ubiquitaire diffuse et diminuée de la protéine Tau dans le modèle Tau et APPxTau.

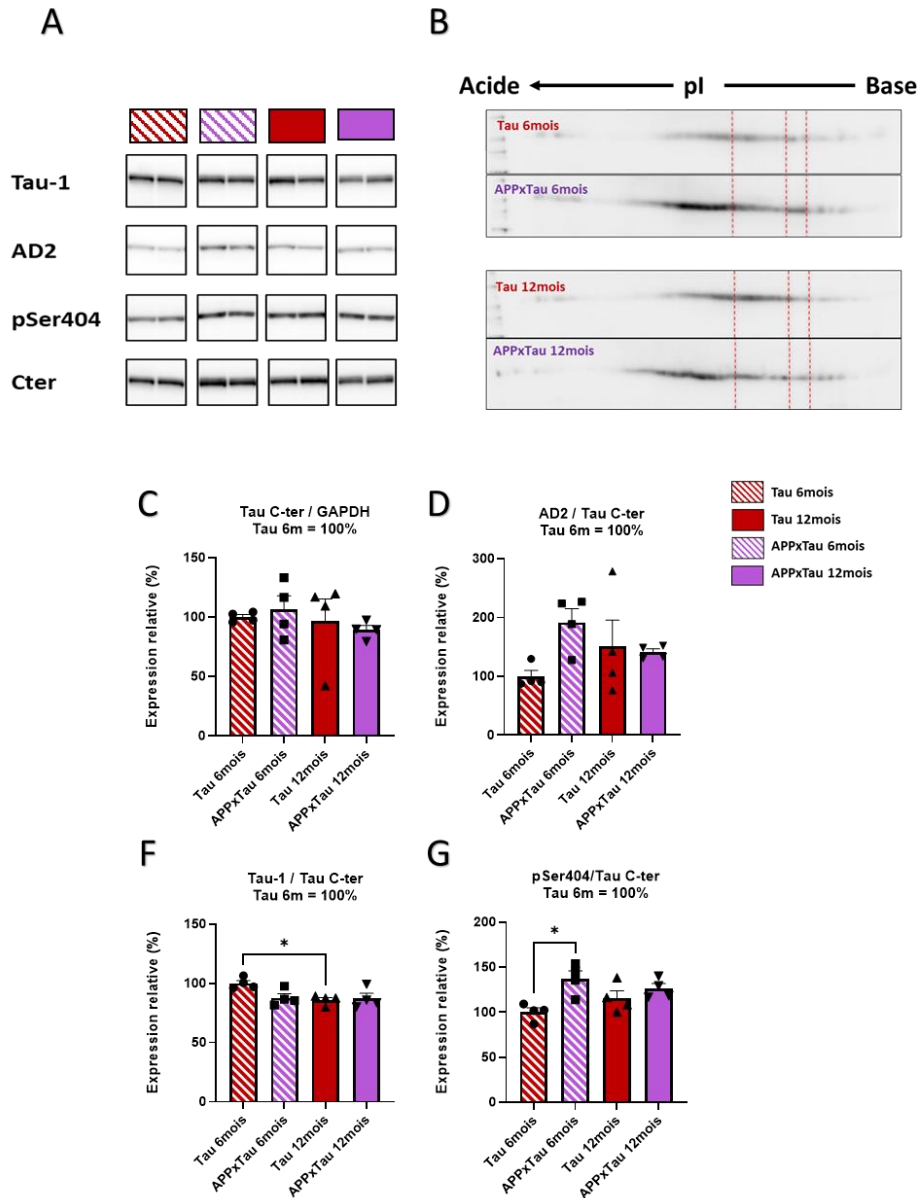


Figure 47 : Hyperphosphorylation de Tau dans les APPxTau femelles à 6 et 12 mois.

(A) Immunoempreinte mettant en évidence la phosphorylation de Tau sur la Sérine 404 (anticorps pSer404), Sérines 396/404 (anticorps AD2), Sérines 195, 198, 199, et 202 (anticorps Tau1) au niveau du cortex dans les femelles Tau et APPxTau à 6 et 12mois. (B) Analyse semi-quantitative de la (dé)phosphorylation de Tau avec les anticorps pSer404, AD2 et Tau1 par rapport à l'expression de Tau totale au niveau du cortex dans les femelles Tau et APPxTau à 6 et 12mois. La Tau humaine totale est marquée avec un anticorps C-ter. (C) Électrophorèse bidimensionnelle et Western blot des isovariants de la Tau totale humaine chez les souris Tau et APPxTau femelles dans le cortex à 6mois (gels du haut) et 12mois (gels du bas) avec un anticorps anti-Tau C-ter (9F6). Statistiques : One-way ANOVA * $p < 0,05$. $n = 4$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

2.5 Au niveau synaptique

Une dérégulation au niveau des protéines synaptiques pourrait aussi expliquer les troubles cognitifs observés avec le test du labyrinthe en Y et le test de Barnes chez les femelles APPxTau. Nous n'avons pas détecté de différence d'expression au niveau de protéines synaptiques comme PSD95 et SNAP25 dans le modèle TauKI à 16 mois. Nous avons donc étudié l'effet de la présence de la pathologie Tau sur l'expression des protéines composant le complexe *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein REceptor* (SNARE) au niveau des APPxTau en comparaison avec les simples mutants et les WT contrôles à 12 mois. Ce complexe est composé de protéines membranaires des vésicules et de protéines situées au niveau de la membrane pré-synaptique. Il permet la fusion de la vésicule contenant le messager chimique avec la membrane afin que celui-ci soit relâché dans la fente synaptique (Chen et al., 2021) (**figure 48A**).

Nous avons par conséquent évalué l'expression des protéines VAMP-2, Synaptogyrine-3, Syntaxine-1, SNAP25, Munc-18 et PSD95 en Western Blot (**figure 48B**). Globalement, le modèle APPxTau présente une augmentation de l'expression relative des protéines vésiculaires par rapport aux simples mutants APP et Tau. L'augmentation de la Synaptogyrine-3 (**figure 48D**) pour le génotype APPxTau par rapport aux simples mutants APP et Tau est très significative. La protéine VAMP-2 montre un signal significativement plus intense chez les APPxTau que chez les APP (**figure 48C**). En revanche les variations ne sont pas significatives entre les doubles mutants et les WT.

En ce qui concerne les protéines pré-synaptiques, SNAP25 (**figure 48H**), Munc-18 (**figure 48H**) et Syntaxine-1 (**figure 48H**), le signal tend à diminuer chez les doubles mutants par rapport aux simples mutants. Cette diminution est significative pour la Syntaxine-1. Les diminutions d'intensité du signal des autres protéines pré-synaptiques (SNAP25 et Munc-18) ne sont pas significatives. La protéine Munc-18 est tout de même plus exprimée dans les simples mutants APP que chez les WT. L'analyse du niveau d'expression de la protéine post-synaptique PSD95 ne montre pas de variation entre les groupes (**figure 48F**). Ce résultat est en revanche contradictoire à des travaux effectués sur le modèle APP qui ont montré une diminution de l'expression de PSD95 dans les modèles APP à 9mois (Saito et al., 2014), qui démontraient une diminution significative de l'expression de PSD95.

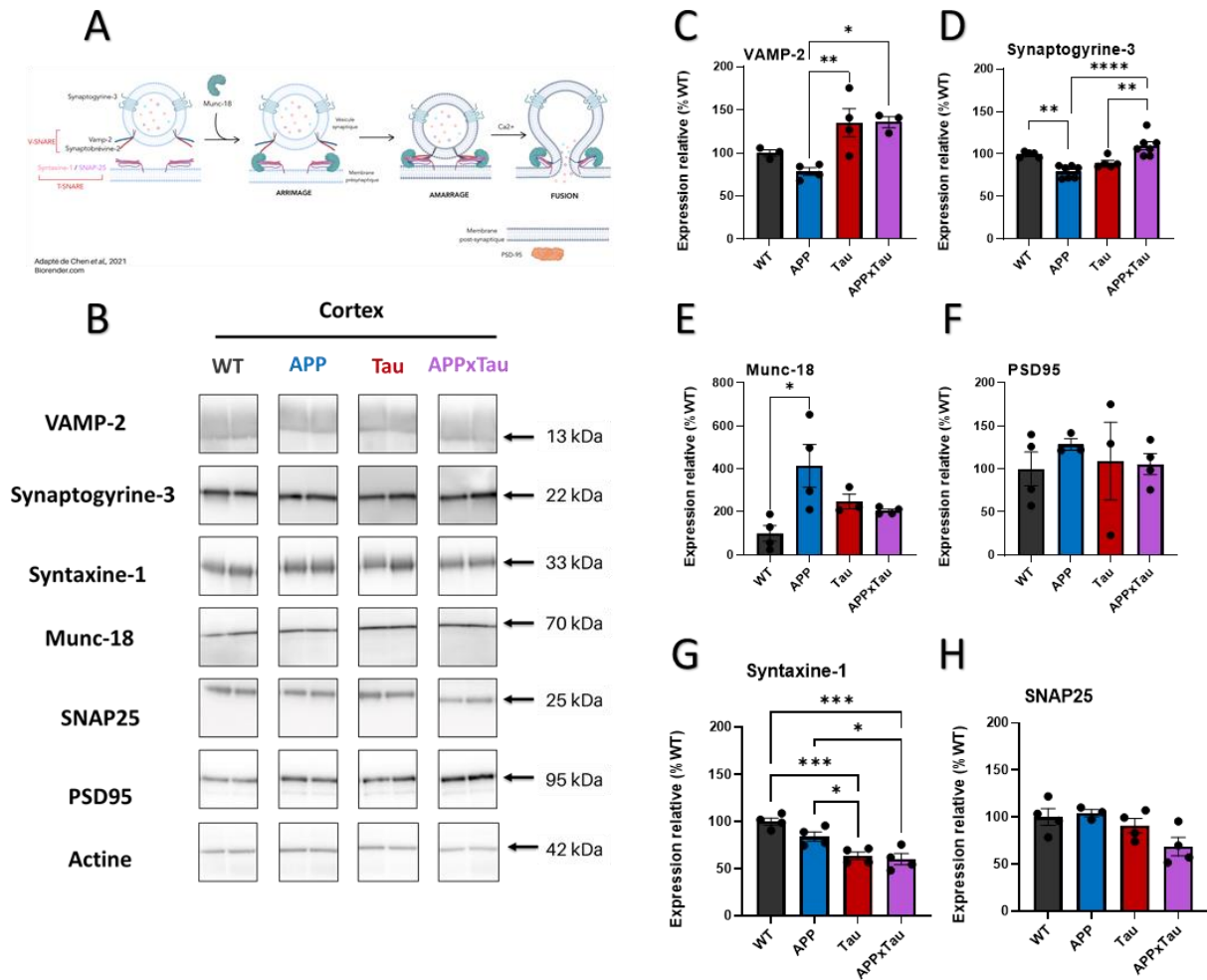


Figure 48 : Variation des marqueurs synaptiques dans le modèle Tau APPxTau à 12 mois.

(A) Représentation schématique des protéines SNARE impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques. L'exocytose est un processus complexe composé de plusieurs étapes distinctes dont l'arrimage, l'amarrage et la fusion. (B) Immunoempreinte mettant en évidence l'expression des protéines VAMP2, Synaptogyrine-3, Syntaxine-1, SNAP25, Munc-18 et PSD95 dans le cortex de souris femelles à 12 mois. Expression relative des protéines (C) VAMP-2, (D) Synaptogyrine-3, (E) Munc-18, (F) PSD95, (G) Syntaxine-1 et (H) SNAP25 exprimée par rapport aux souris WT dans les cortex de souris femelles à 12 mois. L'actine est utilisée en contrôle de charge. Statistiques : One-way ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns $p > 0,05$. $n = 4$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

2.6 Au niveau de la neuroinflammation

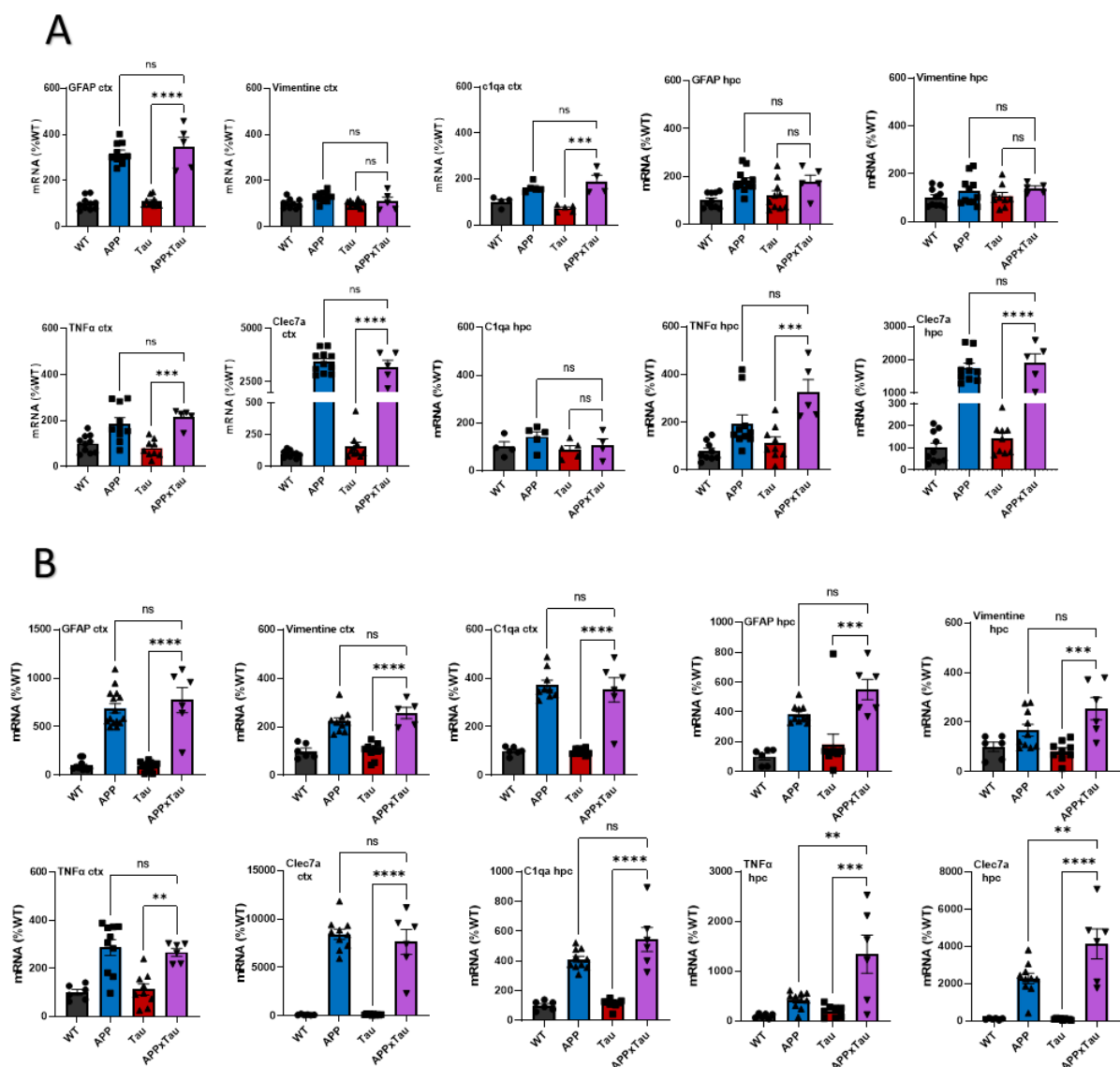


Figure 49 : Evaluation des marqueurs de neuroinflammation en qPCR dans le modèle APPxTau à 6 et 12 mois.

Expression relative des gènes exprimés pas les astrocytes (GFAP et Vimentine), par la microglie (clec7a), le marqueur du complément c1qa ainsi que le facteur de nécrose tumorale TNF α dans le cortex (ctx) et l'hippocampe (hpc) chez les souris simple et double mutantes à l'âge de 6mois en (A) et de 12mois en (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux souris WT. Statistiques : One-way ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns $p > 0,05$. $n > 5$ par groupe.

Les pathologies Tau et amyloïde sont associées au développement d'une inflammation dans le tissu cérébral (Bellucci et al., 2004). Des cellules microgliales et astrocytaires réactives peuvent causer des dommages neuronaux et jouer un rôle critique dans le développement et la progression de la pathologie. Si le modèle Tau KI présente un début d'astroglie à 16 mois, la pathologie amyloïde installée chez le modèle double mutant a donné lieu à une réactivité gliale

beaucoup plus prononcée. En effet, l'analyse en qPCR de plusieurs marqueurs astrocytaires tels que GFAP et la vimentine, des cytokines pro-inflammatoires (CCL4), des récepteurs inflammatoires (Clec7a *C-Type Lectin Domain Containing 7A*, Itgax *Integrin Subunit Alpha X*), du facteur de nécrose tumorale (TNF α) ainsi que du marqueur du complément (c1qa) a montré une dérégulation qui semble être reliée à la pathologie amyloïde dans le cortex et l'hippocampe des souris APP et APPxTau à 6 mois (**figure 49A**) et 12 mois (**figure 49B**). Une différence entre le groupe de souris APP et APPxTau est uniquement observée dans l'hippocampe des souris âgées de 12 mois avec le marqueur TNF α et Clec7a (**figure 49B**). Afin de vérifier l'état d'activation et le regroupement des astrocytes et de la microglie autour des plaques amyloïdes, une co-immunofluorescence a été réalisée avec un anticorps anti-Iba1 pour marquer la microglie et un anticorps anti-GFAP pour marquer les astrocytes. Une contre coloration à la thioflavine-S a aussi été effectuée pour marquer le coeur dense des plaques amyloïdes et ainsi pouvoir évaluer le niveau de densité des plaques dans le modèle APPxTau comparé aux souris APP à 12 mois (**figure 50A**). Ainsi, le nombre de plaques (**figure 50C**) ainsi que la surface marquée (**figure 50D**) à la thioflavine-S par mm² présentent une tendance à l'augmentation de la même façon que pour le marquage avec l'anticorps 6E10 en immunohistochimie visible. De même, la surface occupée par les astrocytes GFAP+ (**figure 50E**) présente une tendance à l'augmentation. Cependant, la surface occupée par la microglie (**figure 50F**) est plus importante dans le modèle APPxTau par rapport aux souris APP. Nous nous sommes donc intéressés au microenvironnement au niveau et autour du coeur dense des plaques amyloïdes (10 μ m) indépendamment de leurs tailles afin d'évaluer le recrutement des astrocytes et de la microglie au niveau du cortex frontal des souris APPxTau et APP (**figure 50B**). Ce microenvironnement du coeur dense des plaques amyloïdes est caractérisé par une réponse astrocytaire et microgliale mais aussi par une dystrophie neuritique qui n'a pas pu être évaluée dans le modèle APPxTau compte tenu de la diminution de la quantité de la protéine Tau exprimée rendant difficile sa visualisation au niveau des neurites dystrophiques. L'analyse du regroupement de la microglie (*clustering*) et de la proximité astrocytaire au voisinage des plaques ($\leq 10\mu$ m) au niveau de la CA1 ainsi qu'au niveau du cortex frontal n'a pas révélé de différence de recrutement de la microglie (**figure 50G**) ni des astrocytes (**figure 50H**). Ainsi, même si la surface marquée par la microglie semble être de façon générale plus importante dans le modèle APPxTau, la substitution de la Tau murine par la Tau humaine dans ce groupe ne semble pas induire plus de dommages neuritiques susceptibles de provoquer plus de recrutement glial au niveau des plaques amyloïdes.

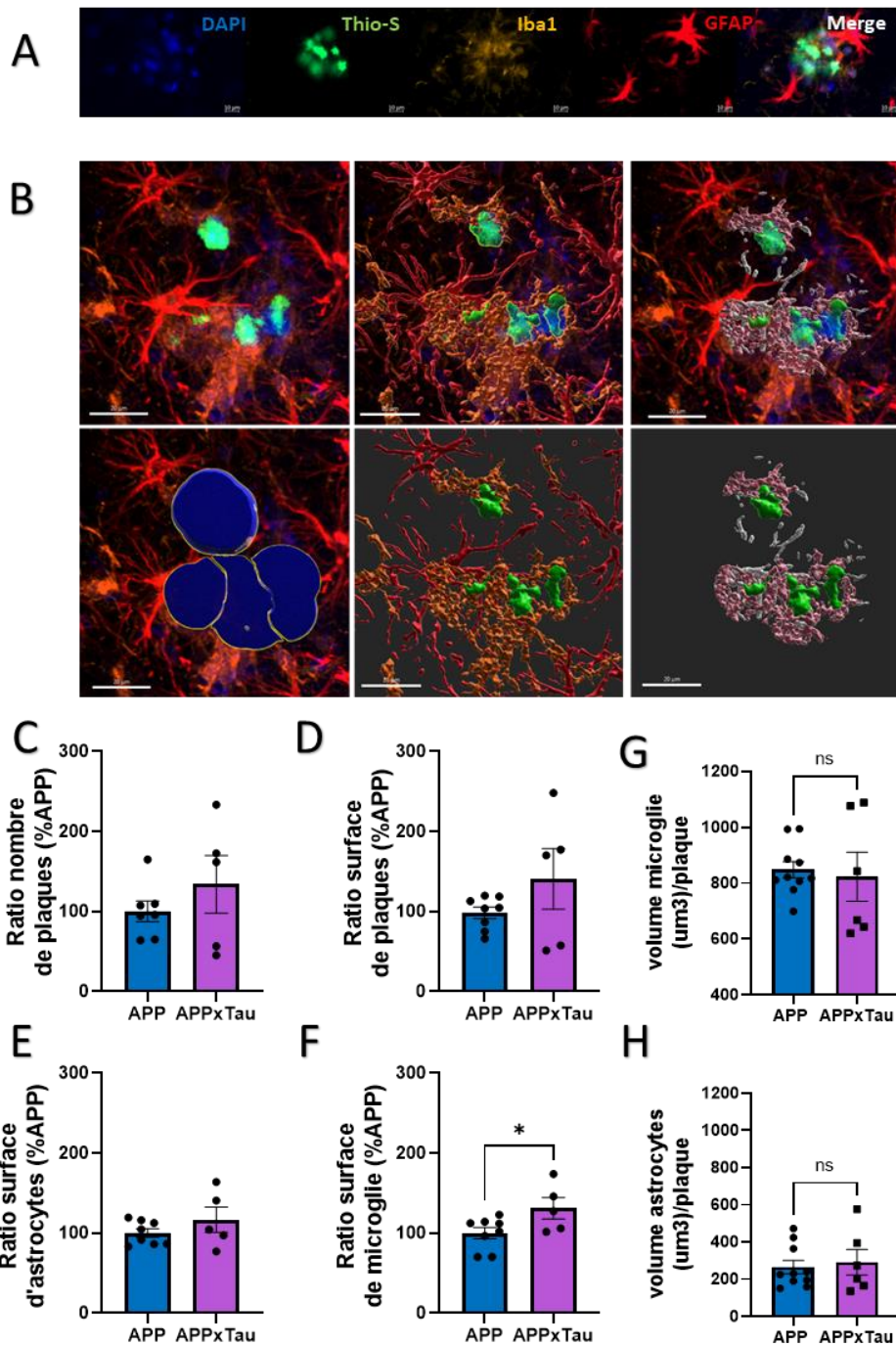


Figure 50 : Evaluation de la neuroinflammation liée à la pathologie amyloïde dans le modèle APPxTau à 12 mois.

(A) Evaluation de la neuroinflammation au niveau du cortex dans les souris APP et APPxTau par immunofluorescence, les plaques amyloïdes sont marquées en vert avec de la thioflavine-S, les astrocytes en rouge avec un anticorps anti-GFAP et la microglie en orange avec un anticorps anti-Iba1. (C) Le ratio du nombre de plaques, (D) le ratio de la surface de plaques marquées, (E) le ratio de surface d'astrocytes et (F) le ratio de la surface de microglie sont représentés par rapport aux souris APP au niveau du cortex frontal. (F) Modélisation 3D du cœur dense de plaques amyloïdes en vert et de la surface occupée par la microglie (en orange) et les astrocytes (en rouge) à 10 µm autour du cœur dense (halo de 10 µm en bleu). (G) Quantification du volume occupé par la microglie et (H) les astrocytes à 10 µm du cœur dense des plaques amyloïdes en µm³/plaque dans le modèle APPxTau et les contrôles APP au niveau du cortex frontal. Statistiques : *t-test* **p*<0,05, ***p*<0,01, *** *p*<0,001, **** *p*<0,0001, ns *p*>0,05. n>5 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy±sem à partir de 3 tranches de cerveau minimum par animal.

De la même façon, nous avons aussi évalué la réactivité microgliale et astrocytaire induite par les injections stéréotaxiques de lysat APP dans le modèle Tau injecté en intrahippocampique avec des lysats issus de souris APP et de souris contrôles WT à un âge de 3mois. La réaction immunitaire a été révélée avec un anticorps anti-Iba1 pour marquer la microglie et un anticorps anti-GFAP pour marquer les astrocytes. La surface marquée par la microglie (**figure 51C**) et par les astrocytes (**figure 51D**) au niveau de l'hippocampe ne montre pas de différence entre les souris Tau KI injectées avec le lysat APP et les lysats contrôles (WT et PBS).

Cette exposition plutôt aigue à l'amyloïde semble donc induire la même réactivité gliale que pour les lysats contrôles malgré la pathologie amyloïde existante dans les lysats APP.

2.7 *Au niveau de l'agrégation de Tau*

Les mutations présentes dans le modèle APP KI confèrent aux peptides amyloïdes une rapidité d'agrégation en plaques amyloïdes ce qui limite la disponibilité de l'A β soluble et par conséquent son interaction avec le milieu environnant. Les sites phospho-dépendants et phospho-indépendants testés dans le modèle APPxTau n'ont montré aucune malconformation ou agrégation de Tau jusque l'âge de 12mois. Nous avons également réalisé un marquage de Tau avec un anticorps AT8 afin de visualiser l'état de phosphorylation de Tau dans les souris Tau KI inoculées avec les lysats APP et les contrôles (WT et PBS). Au bout d'un mois post-injection, aucun signal n'a été observé avec l'anticorps AT8 en immunohistochimie (**figure 51B**). Les lysats APP inoculés dans le modèle Tau KI ne semblent pas induire de processus pathologique de Tau ni son agrégation. L'absence de marquage AT8 ainsi que l'état de l'activité gliale observé à un mois post-injection suggère la clairance des homogénats inoculés dans le modèle Tau KI.

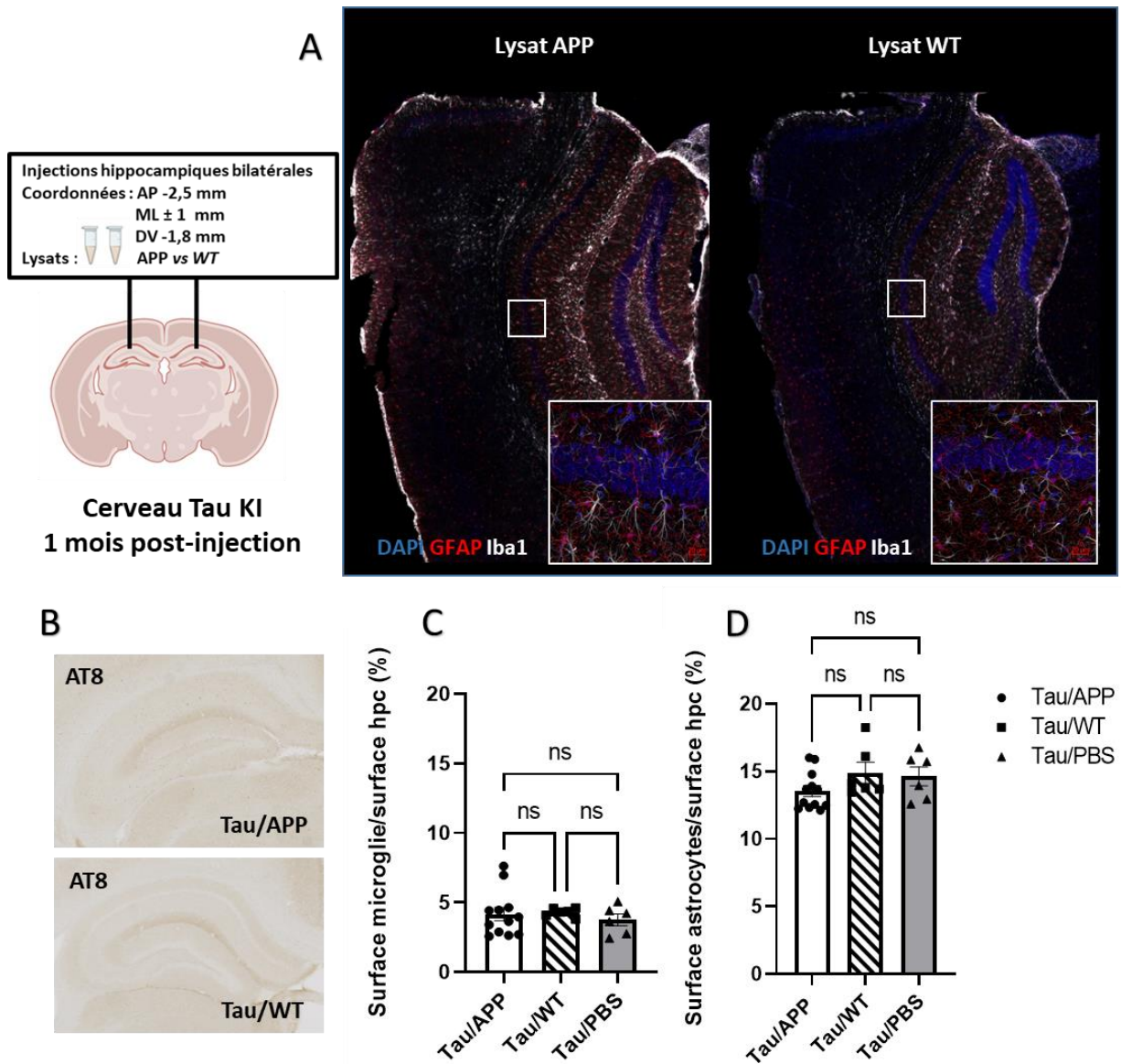


Figure 51 : Effet de l'injection hippocampique de lysats APP et WT dans les souris Tau KI sur la neuroinflammation et l'agrégation de Tau à un mois post-injection.

(A) Images représentatives du marquage avec un marqueur d'astrocytes réactifs GFAP positifs (rouge), un marqueur de microglie Iba1 (blanc) et le DAPI (bleu) au niveau de l'hippocampe (faible grossissement) et de la CA1 (fort grossissement) des souris Tau injectées avec du lysat APP ou WT. Barre d'échelle (fort grossissement) = 20 μ m. (B) Absence d'agrégats dans l'hippocampe en immunohistochimie avec un anticorps AT8 dans les souris Tau KI inoculées avec un lysat APP (en haut) et un lysat WT (en bas). (C) Le pourcentage de la surface totale couverte par les astrocytes positifs à la GFAP et (D) Le pourcentage de la surface totale couverte par la microglie dans l'hippocampe (hpc) sont représentés chez les souris Tau injectées avec du lysat APP, WT et PBS. AP : antéro-postérieur, ML : médial-latéral, DV : dorso-ventral. Statistiques : t-test ns $p > 0,05$. $n \geq 6$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem.

2.8 Evaluation transcriptionnelle des souris Tau KI et APPxTau

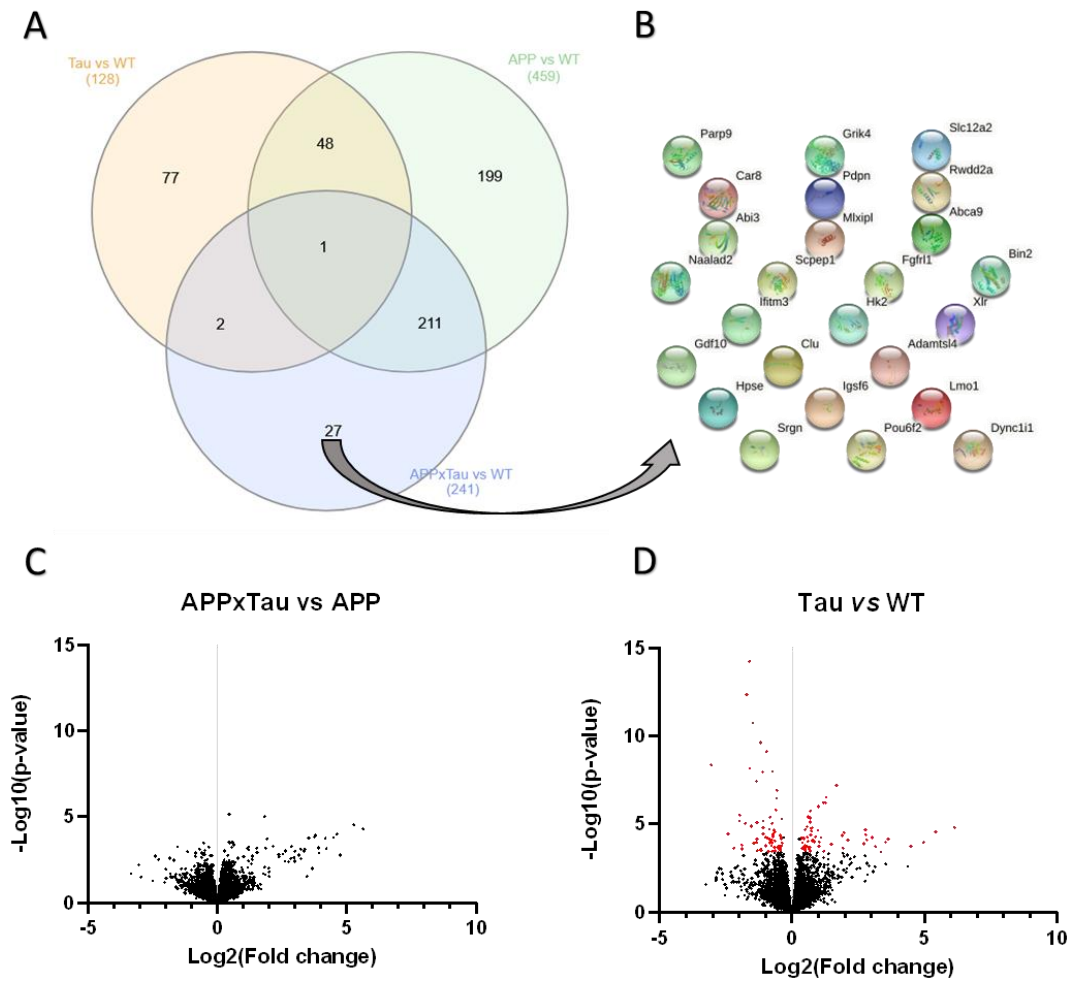


Figure 52 : Séquençage de l'ARNm chez les souris WT, APP, Tau et APPxTau à l'âge de 12 mois.

(A) Représentation du nombre de gènes dérégulés dans chaque groupe en intersection avec les autres groupes. Une dérégulation importante de gènes est observée entre les souris APP et WT (459) ainsi qu'entre les souris APPxTau et WT (241). Des changements transcriptomiques propres aux souris Tau sont aussi décelés (77 gènes sont dérégulés significativement par rapport aux souris WT). (B) Représentation des 27 gènes exclusivement dérégulés chez les souris APPxTau en analyse par la base de données en ligne STRING. (C) Volcano plot montrant l'absence de gènes dérégulés entre les souris APP et APPxTau (D) Volcano plot montrant les 128 gènes significativement dérégulés chez les souris Tau comparées aux souris WT (*adjusted p-value* < 0,05 et *Log2FoldChange* > 0,32 en rouge). Parmi les 128 gènes, 68 gènes sont retrouvés sous-exprimés et 60 gènes sont retrouvés surexprimés dans les souris Tau par rapport aux souris WT. n=4 par génotype.

Dans le but de mieux comprendre les conséquences de l'expression de la Tau 1N4R humaine mutée P301L sous le contrôle du promoteur murin dans le modèle Tau KI et APPxTau, nous avons réalisé un séquençage de l'ARNm à partir des cortex des souris âgées de 12 mois des différents modèles utilisés dans notre étude (WT, APP, Tau et APPxTau) (**figure 52A**). En comparant les souris APPxTau par rapport aux souris WT, nous avons trouvé 241 gènes différentiellement et

significativement exprimés ($\text{Log}_2\text{FoldChange} > 0,32$, adjusted p-value $< 0,05$). Nous avons comparé ces gènes à la liste des gènes différentiellement exprimés dans les souris APP par rapport aux souris WT, il s'est avéré que seulement 27 de ces gènes étaient différentiellement et significativement ($\text{Log}_2\text{oldChange} > 0,32$, adjusted p-value $< 0,05$) exprimés exclusivement chez les APPXTau. En utilisant la base de données STRING, aucune interaction entre ces 27 gènes n'a été décelée (**figure 52B**).

De façon intéressante, une dérégulation de 128 gènes a été observée entre les souris Tau et WT. 68 gènes sont retrouvés sous-exprimés et 60 gènes surexprimés ($\text{Log}_2\text{oldChange} > 0,32$, adjusted p-value $< 0,05$) (**figure 52D**). Une interaction forte entre un nombre de ces gènes a été observée en utilisant la base de données STRING (**figure 53B**). L'analyse *in silico* de l'annotation fonctionnelle a été effectuée en utilisant la base de données DAVID et a permis d'identifier les voies moléculaires dans lesquelles ces gènes sous-exprimés sont enrichis. 8 de ces gènes sont associés à la transmission synaptique chimique et 6 à la réponse à l'AMPc (*Goterm Biological Process*) (**figure 53A**). Parmi ces gènes sous-régulés, nous avons trouvé *Dusp1*, *Fosb*, *Junb*, *Nr4a1* et *Nr4a3* qui ont été validés par des expériences de PCR quantitative (qPCR) avec la totalité des échantillons de souris âgées de 12 mois (**figure 53C**).

Ces derniers font partie d'un sous ensemble de gènes impliqués dans la plasticité par des stimuli, connus sous le nom d'IEG (*Immediate Early Genes*). Ils sont impliqués dans la potentialisation à long terme par des cascades qui promeuvent la synthèse d'ARNm et de protéines en raison de leur réactivité transitoire rapide à l'activation synaptique (Okuno et al., 2012).

Les IEG sont connus pour être induits dans des régions spécifiques du cerveau pendant l'activité neuronale associée à des tâches comportementales. Leur transcription rapide dans l'hippocampe se produit durant des paradigmes d'apprentissage comme la piscine de Morris, l'exposition à un nouvel environnement ou le test de *fear conditioning* (Hall et al., 2001; Ramirez-Amaya, 2005; Mamiya et al., 2009).

Certaines études ont démontré que les tâches d'apprentissage dépendantes de l'hippocampe induisent immédiatement l'expression d'IEG dans les zones corticales (Tse et al., 2011; Czajkowski et al., 2014). En outre, l'activation corticale dans une phase précoce de la formation de la mémoire induit des changements fonctionnels dans les neurones corticaux (Bero et al., 2014) et contribue à la formation de la mémoire (Lesburguères et al., 2011), ce qui laisse penser que la phase précoce (récente) de la mémoire existe dans le néocortex ainsi que dans l'hippocampe. Les résultats de qPCR conduits sur les gènes *fos-b*, *dusp1*, *c-fos*, *JunB*, *Nr4a1* et *Nr4a3* concernent le cortex, qui en accord avec les résultats de l'analyse transcriptionnelle, montrent une diminution dans le modèle Tau KI au niveau du cortex. Certains de ces marqueurs sont aussi retrouvés

significativement diminués dans le modèle APP KI (dusp1, c-fos, JunB et Nr4a3) et APPxTau (dusp1 et JunB) (**figure 53C**).

A la lumière des effets des IEG dans l'apprentissage, nous supposons que la régulation négative à long terme des IEG pourrait contribuer aux déficits de mémoire observés dans nos expériences comportementales chez les souris APP et APPxTau. Cela pourrait être dû à une altération du maintien de la LTP et, par conséquent, à des déficits d'apprentissage. Nous pouvons supposer que ces dérégulations précoces puissent être à l'origine, en partie, des troubles de la mémoire à court terme observés plus tardivement à 16 mois dans le modèle Tau KI. Toutefois, afin de confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire d'étudier l'activité neuronale en détail par l'intermédiaire d'une étude électrophysiologique par exemple.

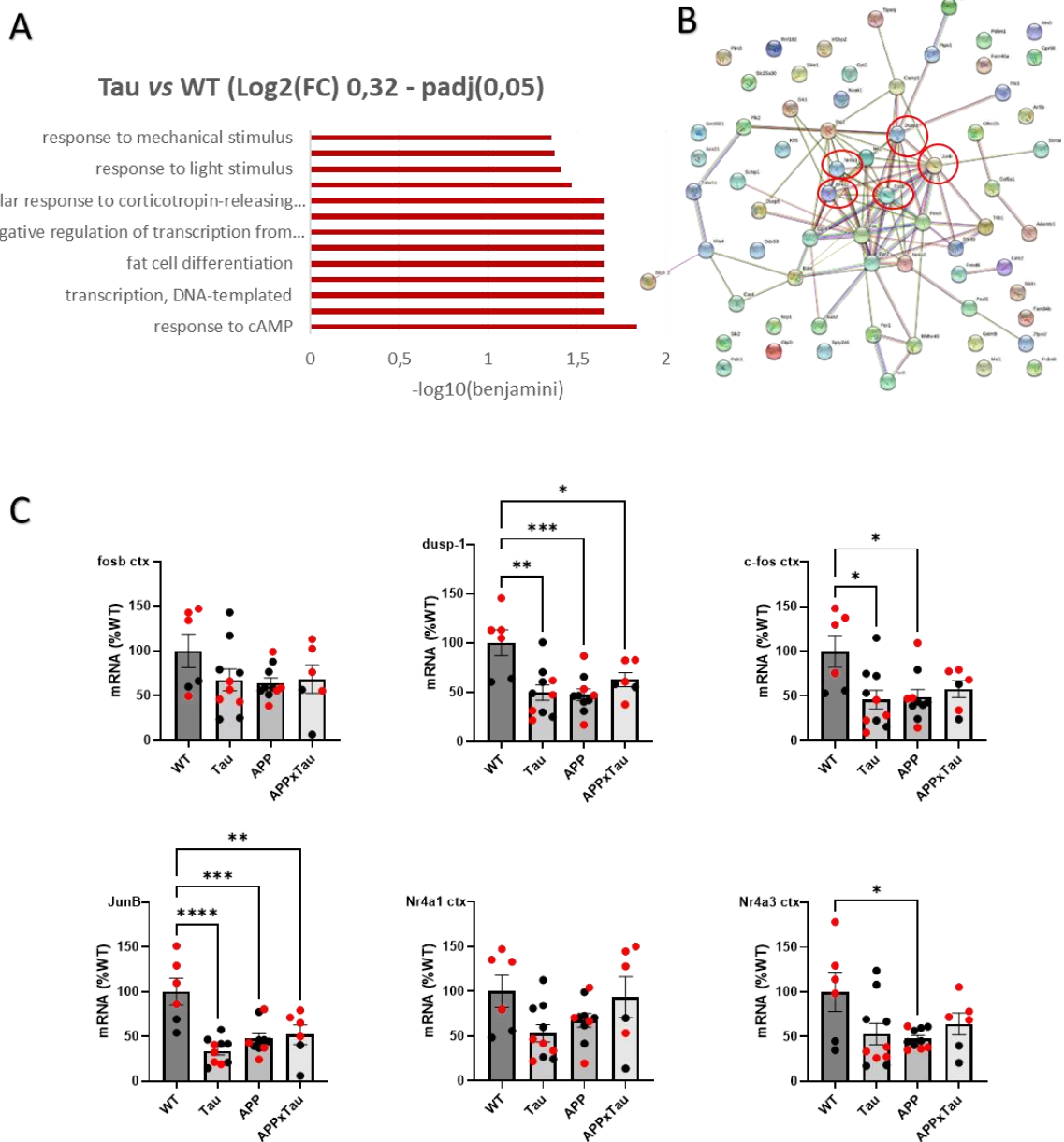


Figure 53 : L'expression de la protéine Tau 1N4R humaine mutée dérégule l'expression des IEGs.

(A) L'annotation fonctionnelle des gènes dérégulés chez les souris Tau a été réalisée sur le logiciel DAVID pour les GOTERM Biological Process et révèle une association significative des gènes sous exprimés avec la réponse à l'AMPc (Benjamini p-value). (B) les interactions protéiques connues et putatives des gènes ont été analysées par la base de données en ligne STRING pour les 68 gènes sous-exprimés et montre un regroupement de gènes important qui sont connus pour être des IEGs. (C) Certains IEGs (cercles rouges dans (B)) ont été sélectionnés pour une validation en qPCR. Les points rouges sont associés aux échantillons des souris femelles utilisées pour l'analyse de séquençage de l'ARNm.

Etude 3 : Potentiel pathologique de la protéine Tau humaine mutée exprimée dans le modèle Tau KI

Les formes de Tau pathologiques sont connues pour être internalisées par d'autres neurones et recruter des formes physiologiques. En absence d'induction de l'agrégation de la protéine Tau humaine dans le modèle Tau KI (avec les croisements et l'inoculation de lysats APP), nous nous sommes intéressés à l'interaction de cette protéine Tau humaine mutée avec des espèces de Tau potentiellement pathologiques issues de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Pour ce faire, l'inoculation de lysats de cerveaux de patients atteints de MA et de cerveaux de sujets témoins (contrôles) a été réalisée dans la région hippocampique de souris Tau KI âgées de 3 mois (**figure 54**). Injecter des espèces de Tau mal conformées permettrait de causer le repliement pathologique au niveau de la protéine Tau exprimée par le modèle et serait susceptible d'induire une cascade conduisant à sa phosphorylation, agrégation et propagation. Notre but était d'obtenir un modèle de propagation plus physiologique que les modèles disponibles.

Ces injections n'ont pas donné les résultats attendus. Les espèces de Tau pathologiques contenus dans les lysats humains ne semblent pas induire de pathologie Tau dans le modèle Tau KI. La plupart des modèles de propagation utilisent des modèles de surexpression du transgène. Or dans notre cas, l'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur murin. Cependant, une mutation P301L est présente mais ne semble pas modifier la réactivité de cette espèce de Tau ni son aptitude à s'agréger. En effet, nous n'avons pas pu observer de phosphorylation de Tau avec un anticorps AT8 en immunohistochimie dans les groupes injectés avec des lysats de patients atteints de MA comme pour le groupe injecté avec les lysats contrôles (**figure 54B**).

Nous avons également visualisé la réponse gliale induite par ces injections par immunofluorescence avec un anticorps anti-Iba1 pour marquer la microglie et un anti-GFAP pour marquer les astrocytes. Le marquage montre une cicatrisation gliale au niveau des sites d'injection mais aucune différence au niveau de la réactivité gliale au niveau de l'hippocampe entre les injections de lysats de patients atteints de MA et les lysats contrôles (**figure 54A**). Ainsi la surface marquée par la microglie (**figure 54C**) ainsi que la surface occupée par les astrocytes (**figure 54D**) marqués ne montrent pas de différence entre les deux groupes par quantification du signal en immunofluorescence.

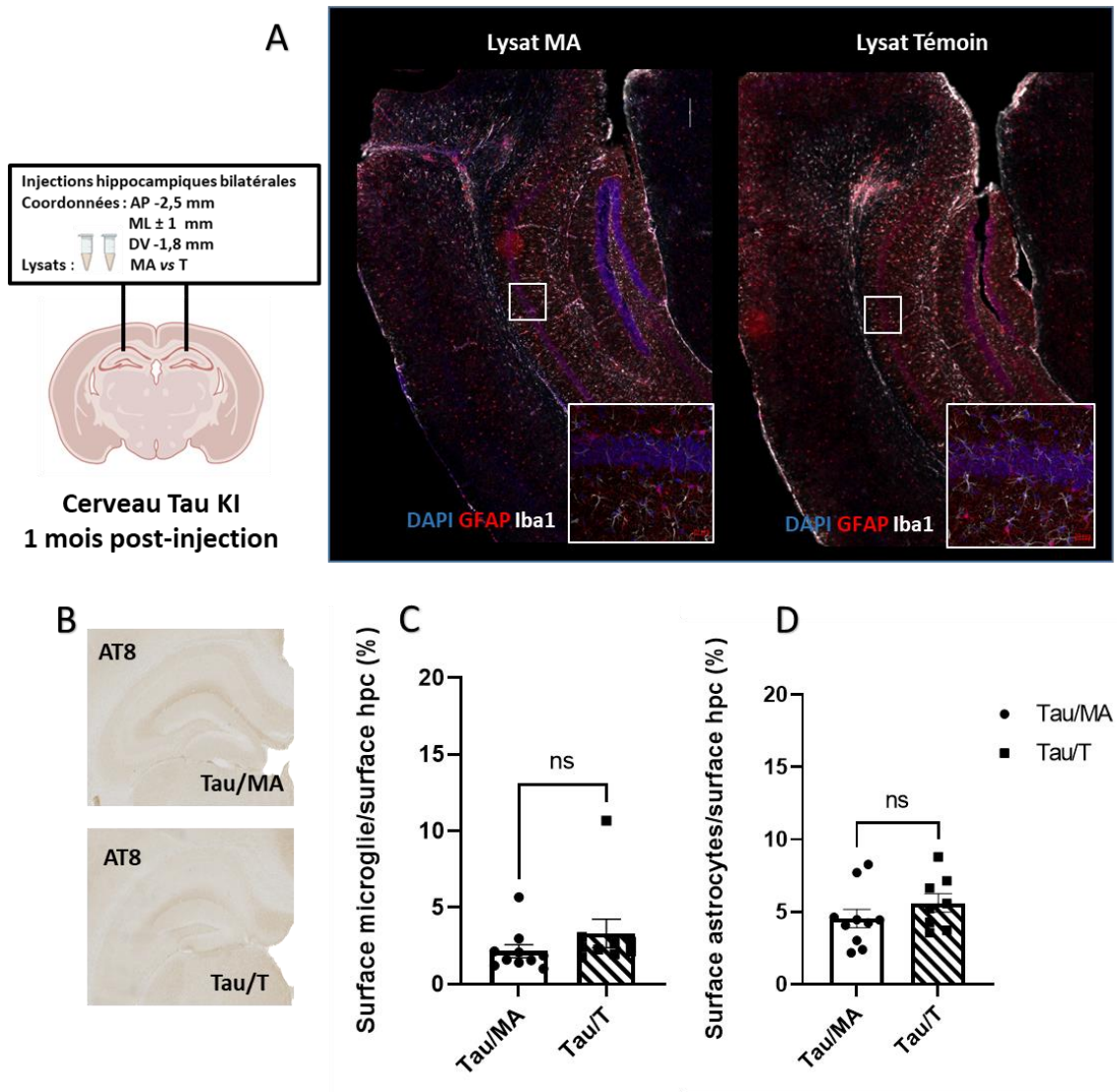


Figure 54 : Cicatrisation gliale et absence d'agrégats de Tau avec l'injection hippocampique de lysats de patients atteints de MA et de sujets témoins dans le modèle Tau KI à un mois post-injection.

(A) Images représentatives d'immunofluorescence avec un marqueur d'astrocytes réactifs GFAP (rouge), un marqueur de microglie Iba1 (blanc) et le DAPI (bleu) au niveau de l'hippocampe (faible grossissement) et de la CA1 (fort grossissement) des souris Tau KI injectées avec du lysat de patients atteints de la MA et du lysat de sujets témoins. Barre d'échelle = 20µm. (B) Absence d'agrégats dans l'hippocampe en immunohistochimie avec un anticorps AT8 dans les souris Tau KI inoculées avec un lysat MA (en haut) et témoin (en bas). (C) Le pourcentage de la surface totale couverte par les astrocytes positifs à la GFAP et le pourcentage de (D) la surface totale couverte par la microglie dans l'hippocampe sont représentés dans les souris Tau injectées avec du lysat MA et témoins (T). AP : antéro-postérieur, ML : médial-latéral, DV : dorso-ventral. Statistiques : t-test ns $p > 0,05$. $n \geq 6$ par groupe. Les résultats sont exprimés en moy±sem.

Afin de savoir si la protéine Tau humaine mutée pouvait induire un processus pathologique et agir à son tour comme une espèce pro-nucléante en recrutant la protéine Tau de souris sauvages, l'inoculation de lysats de cerveaux de souris Tau KI en région hippocampique dans des souris APP KI âgées de 3mois le niveau a été réalisée (**figure 55A**). Des contrôles positifs ont été menés avec des lysats issus de souris THY-Tau22 (modèle de surexpression de l'isoforme 1N4R humaine mutée disponible au sein du laboratoire).

Par conséquent, nous attendions dans un premier temps que la protéine Tau humaine mutée et donc pro-agrégative puisse recruter la Tau murine présente chez les souris APP dans un contexte de pathologie amyloïde accompagnée de neuroinflammation et conduire à une pathologie Tau visible. Un marquage avec AT8 en immunohistochimie a permis de détecter de la Tau phosphorylée au niveau des plaques neuritiques (**figure 55D**). Ces résultats ont été répliqués en immunofluorescence avec une contre coloration du coeur dense des plaques amyloïdes afin de pouvoir quantifier le signal avec le logiciel Imaris (les analyses sont en cours) et pouvoir évaluer le niveau de recrutement de la protéine Tau humaine dans les plaques neuritiques par rapport à la protéine Tau de souris. L'évaluation de la pathologie Tau, en particulier dans les neurites dystrophiques, en comparaison entre les lysats Tau et WT serait également une façon de cerner si l'expression diminuée de la protéine Tau humaine mutée dans le modèle Tau KI agit sur sa disponibilité et son potentiel pathologique.

Dans un deuxième temps, il était intéressant d'évaluer le potentiel pathologique de la protéine Tau humaine mutée sur la pathologie amyloïde déjà installée. Cependant, la quantification du nombre total de plaques amyloïdes (**figure 55B**) ou en fonction de la taille dans l'hippocampe (**figure 55C**) ne montre pas de différence entre le groupe APP injecté avec le lysat Tau et le groupe contrôle. De façon intéressante, nous avons remarqué une différence de potentialisation au niveau du nombre de plaques détecté en immunohistochimie chez les mâles (points rouges) et les femelles (points noirs) (**figure 55B**). La pathologie amyloïde chez les mâles semble être aggravé à la suite des injections avec les lysats Tau mais pas chez les femelles. La pathologie amyloïde a aussi été évaluée dans les souris contrôles injectées parallèlement avec un lysat de souris THY-Tau22 dans le but de pouvoir comparer la capacité de propagation de la Tau humaine mutée présente chez le modèle THY-Tau22 avec le modèle Tau KI. Le nombre de ces souris contrôles est faible mais les résultats montrent une augmentation significative du nombre de plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe par rapport au groupe APP injecté avec les lysats Tau et WT (**figure 55B**). En effet, des études antérieures ont montré un rôle potentialisateur d'A β sur la pathologie Tau dans des modèles de surexpression (Lewis, 2001; Bolmont et al., 2007 ; He et al., 2018; Vergara et al., 2019).

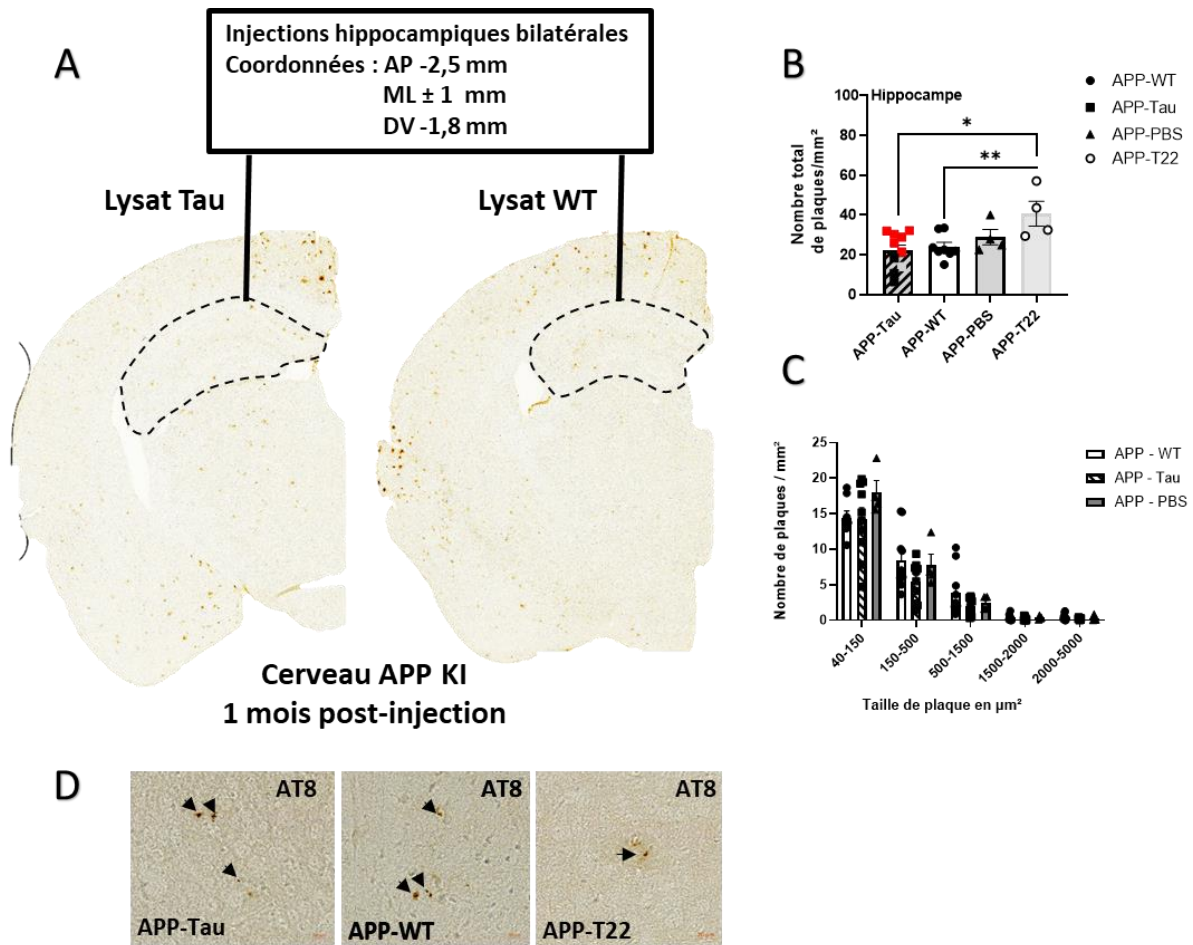


Figure 55 : Effet de l'injection hippocampique de lysat Tau chez des souris APP l'agrégation des peptides amyloïdes et la phosphorylation de Tau dans les neurites dystrophiques.

(A) Images représentatives de l'immunohistochimie utilisant un anticorps 6E10 anti-A β dans le cortex et l'hippocampe de souris APP injectées avec du lysat Tau et WT en région hippocampique. (B) Quantification du nombre total de plaques par mm² dans l'hippocampe selon le lysat injecté avec le lysat Tau, WT et THY-Tau 22. Statistiques : One-way ANOVA ns p>0,05. (C) Distribution des plaques amyloïdes selon leur taille au niveau de l'hippocampe selon le lysat injecté. Visualisation de la protéine Tau phosphorylée dans les plaques neuritiques (indiqués par les flèches) en immunohistochimie avec un anticorps AT8 dans les souris APP KI inoculées avec le lysat Tau, WT et THY-Tau22 (T22). Statistiques : Two-way ANOVA ns p>0,05. n \geq 4 par groupe. Les résultats sont exprimés en moy \pm sem. AP : antéro-postérieur, ML : médial-latéral, DV : dorso-ventral.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La maladie d'Alzheimer, démence la plus répandue dans le monde, fait l'objet de nombreuses recherches afin de mieux comprendre sa physiopathologie et trouver un traitement. Pour cela, de nombreuses équipes ont essayé de générer des modèles animaux afin de mimer les symptômes, les lésions ou les causes de la MA. Ces modèles sont particulièrement difficiles à produire en raison de la complexité et de l'aspect multifactoriel de la MA. La plupart des modèles utilisés repose actuellement sur la surexpression de protéines humaines mutées permettant de générer les lésions A β et/ou Tau. Toutefois, bien que ces modèles transgéniques aient permis des avancées majeures dans la compréhension de la pathologie, son évolution et les mécanismes mis en jeu, ils ont également de nombreuses limites empêchant une totale compréhension de la MA. Par exemple, la surexpression d'APP, conduisant à l'apparition de dépôts amyloïdes, ne permet pas de distinguer les effets d'A β des autres fragments notamment les CTF. De plus, la pertinence de ces modèles est discutable du fait de la surexpression de protéines mutées, n'existant pas chez l'homme, ainsi que de la sévérité des phénotypes retrouvés dans ces modèles. Par ailleurs, une grande partie de ces modèles ne développe qu'une des deux lésions, permettant de mimer seulement partiellement la pathologie, alors qu'il est largement admis que les deux lésions agissent conjointement. Ainsi, pour pallier ces limites, nous avons généré un modèle murin *Knock-In* pour Tau, que nous avons croisé avec des souris *Knock-In* pour APP (Saito et al., 2014), générant des souris *Knock-In* APPxTau.

1 **Un nouveau modèle *Knock-In* de perte de fonction de Tau exprimant P301L Tau sous le contrôle du promoteur *Mapt* murin**

Pour pallier la différence structurale de la différence de séquence primaire entre la protéine Tau humaine et la protéine Tau murine et s'affranchir de la surexpression, nous avons développé le modèle Tau KI qui exprime uniquement l'isoforme de Tau humaine 1N4R mutée P301L sous le contrôle du promoteur *Mapt* murin. Cette mutation sur le gène MAPT est connue pour causer la dégénérescence lobaire fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien chez l'homme. *In vitro*, il a été démontré que cette mutation accélère la formation de filaments hélicoïdaux appariés (Barghorn et al., 2000). Elle favorise également fortement la formation de feuilletts β pendant l'agrégation (von Bergen et al., 2001; Fischer et al., 2007). La mutation P301L n'affecte que les isoformes Tau 4R puisqu'elle se localise au niveau de la région répétée R2 du domaine de liaison aux microtubules et n'est pas associée à une modification de l'épissage de l'exon 10. Une perte de fonction de Tau au niveau des microtubules, résultat de leur déstabilisation, peut donc être observée. La perte de fonction de Tau serait nécessaire pour amorcer un processus de « gain de fonction toxique » conduisant à la neurodégénérescence (Goedert and Jakes, 2005). Contrairement aux modèles d'expression exclusive dans le SNC (système nerveux central), le

transgène étant sous contrôle du promoteur endogène, ce modèle a l'avantage d'exprimer la protéine Tau mutée à des niveaux et à des sites d'expression physiologiques, permettant d'étudier son rôle tant au niveau central que dans les tissus périphériques où elle est normalement exprimée, comme le foie ou le pancréas.

1.1 Altération de l'homéostasie du glucose dans le modèle Tau KI

1.1.1 Implication du dysfonctionnement de Tau dans la dyshoméostasie du glucose

Le diabète de type 2 est un des principaux facteurs de risque de la MA (Zhang et al., 2017). Néanmoins, l'origine des dyshoméostasies du glucose chez les patients atteints de la MA ou de FTLN n'est toujours pas totalement élucidée (Ahmed et al., 2014 ; Tortelli et al., 2017). Toutefois, des travaux antérieurs du laboratoire et d'autres ont montré un rôle de la perte de fonction de Tau dans les troubles de l'homéostasie du glucose (Marciniak et al., 2017; Wijesekara et al., 2018a). Ainsi, afin de mieux comprendre les liens entre la perte de fonction de Tau et les troubles métaboliques, nous avons soumis les souris Tau KI à un régime riche en graisse durant 3 mois jusqu'à l'âge de 5 mois. Nos résultats indiquent que les souris Tau KI mâles sous régime riche en graisse présentent une altération du métabolisme glucidique, de la même façon que les souris Tau KO (Marciniak et al., 2017), mais sans biais de surexpression ou de délétion constitutive. Nos données supportent davantage des dysfonctions pancréatiques qu'une insulino-résistance périphérique. En effet, les kinases impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline ne sont pas modifiées dans les tissus périphériques insulino-sensibles. Nous avons pu mettre en évidence, *ex vivo*, que les îlots pancréatiques sécrètent moins d'insuline en réponse à une forte charge en glucose par rapport aux souris WT, et ce de la même façon que les îlots de souris Tau KO, suggérant un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, nous avons montré que la protéine Tau est exprimée dans les cellules bêta pancréatiques, mais pas les cellules alpha. Bien que la fonction de Tau dans les cellules bêta pancréatiques ne soit pas connue, une récente étude rapporte que des doses élevées de glucose induisent la déstabilisation des microtubules médiée par une activation de plusieurs kinases qui phosphorylent Tau (GSK3, CDK5...) (Ho et al., 2020). Par conséquent, chez les souris Tau KI, la protéine Tau pourrait être davantage détachée des microtubules, ne permettant pas le transport des vésicules contenant l'insuline le long de ces derniers, et empêchant donc leur relargage dans le milieu extracellulaire, pouvant contribuer à l'hyperglycémie observée. De plus, outre les dysfonctions pancréatiques, il est possible que, de la même façon que chez les souris Tau KO, les souris Tau KI puissent présenter une insulino-résistance centrale.

1.1.2 Impact du sexe sur la capacité de régulation de l'homéostasie du glucose et la réponse au stress métabolique

L'absence d'altération de l'homéostasie glucidique dans les souris femelles suggère une résistance au régime riche en graisse par rapport aux mâles. Ces différences dépendantes du sexe ont déjà été rapportées dans un modèle murin non-transgénique soumis au même régime utilisant la même souche de souris (C57BL/6J), avec une intolérance au glucose plus prononcée chez les mâles associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Casimiro et al., 2021). En effet, chez l'humain, les femmes ont une moindre tendance à développer un diabète de type 2 que les hommes (Kautzky-Willer et al., 2016). Des études ont démontré que les œstrogènes suppriment la production hépatique de glucose par l'activation de la signalisation des récepteurs aux œstrogènes, qui peut être indépendante des substrats des récepteurs de l'insuline Irs1 et Irs2. Cela révèle un mécanisme important pour l'œstrogène dans la régulation de l'homéostasie du glucose (Yan et al., 2019). Ainsi, la complexité de la compréhension du processus physiopathologique de la maladie est renforcée par les différences existantes entre mâles et femelles.

1.2 *Troubles précoces de Tauopathies dans le modèle Tau KI*

1.2.1 Influence de l'âge sur le métabolisme dans le modèle Tau KI

Nos études sur le modèle Tau KI à 16 mois ont été uniquement conduites chez les femelles. Bien qu'il n'y ait pas de défaut métabolique sous régime riche en graisse à 5 mois chez les femelles, nous avons effectué une analyse du profil métabolique à 16 mois, afin de déterminer si celui-ci pouvait être altéré avec l'âge sous régime standard. Nos résultats montrent une augmentation de la masse pondérale à 16 mois corrélée à un moindre apport nutritionnel et une moindre dépense énergétique, ce qui est également observé plus précocement à l'âge de 6 mois. Des mesures du taux de leptine circulante, représentative de la masse grasse, ou une exploration du tissu adipeux brun pourraient être des pistes pour explorer les raisons de ce gain de poids. En effet, le tissu adipeux brun (BAT) joue un rôle clé dans la thermogénèse, un défaut de celle-ci pourrait expliquer l'augmentation de la masse pondérale. L'expression de certains marqueurs comme la protéine découplante Thermogénine (UCP1) peut fournir plus de renseignement sur son fonctionnement (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019). La température de la peau entourant le BAT peut aussi être visualisée avec des caméras infrarouge. De plus, une altération du processus de lipolyse pourrait suggérer un stockage de masse grasse plus important dans le tissu adipeux.

1.2.2 Absence d'agrégation de la protéine Tau à 16 mois

L'évaluation de la pathologie Tau à 16 mois n'a pas révélé d'hyperphosphorylation ou phosphorylation anormale sur les sites testés (comme pSer262, 396, 422) ni agrégation visible de la protéine Tau. La protéine Tau contient plus de 80 sites de phosphorylation potentiels qui ne

peuvent pas être tous évalués en Western Blot. Néanmoins, des techniques comme l'électrophorèse bidimensionnelle, ou encore la spectrométrie de masse basée sur le phosphoprotéome, qui serait une approche idéale pour adresser l'état de phosphorylation de la protéine Tau, pourraient être effectuées. De plus, l'utilisation des techniques de détection de Western Blot et d'immunohistochimie montre leurs limites étant donné qu'il est très difficile de quantifier l'état de phosphorylation de la Tau humaine mutée. Afin de déceler des changements plus subtils indépendamment de la phosphorylation de la protéine Tau tels que la diminution de la solubilité, un fractionnement soluble/insoluble a été effectué. Nous n'avons pas révélé de modification de la solubilité de la protéine Tau humaine par rapport aux contrôles en utilisant cette technique.

1.2.3 Effet de la perte de fonction de Tau sur la mémoire spatiale

En absence d'agrégation de Tau, nous avons observé une altération de la mémoire spatiale à court terme par le test du labyrinthe en Y dans le modèle Tau KI à 16 mois. Ainsi, au-delà de son rôle dans l'altération de l'homéostasie de glucose, la perte de fonction de Tau au niveau de l'hippocampe par exemple peut induire des déficits cognitifs. En effet, en accord avec nos données, des études ont montré un rôle important de Tau dans l'apprentissage spatial et la mémorisation (Velazquez et al., 2018). Dans ces travaux, la réduction des niveaux de Tau hippocampiques a été corrélée avec des niveaux de BDNF et de densité d'épines dendritiques réduits associés aux déficits cognitifs observés. De façon surprenante, nos résultats de séquençage d'ARNm montrent une diminution des IEGs qui ont un rôle dans la plasticité synaptique et les ensembles neuronaux qui sont impliqués dans la trace mnésique (Minatohara et al., 2016). Ceci suggère une hypoexcitabilité neuronale dans le modèle Tau KI contrairement à ce qui est observé dans le modèle THY-Tau22 du laboratoire et d'autres surexprimant une protéine Tau humaine mutée (Gomez-Murcia et al., 2020; Przybyla et al., 2020). Ainsi, il se pourrait qu'une perte de fonction de la Tau humaine mutée puisse entraîner un dysfonctionnement du réseau neuronal dans ce sens. En effet, en accord avec nos données, des études montrent que la protéine Tau murine mutée P301S dans des modèles transgéniques pour Tau induit une hypoexcitabilité neuronale en absence d'enchevêtrements neurofibrillaires (Marinković et al., 2019). Ce phénomène serait relié à la protéine Tau soluble dans ces modèles. Cette hypothèse nécessite une confirmation notamment par immunohistochimie ou encore par technique d'hybridation *in situ* après stimulation comportementale par exemple.

1.2.4 Implication précoce des astrocytes dans l'altération de la mémoire

Le dysfonctionnement astrocytaire dans les Tauopathies pourrait entraîner des répercussions sur le fonctionnement neuronal (Hartnell et al., 2021). Une augmentation de l'expression de la GFAP, protéine majeure qui constitue les filaments intermédiaires des astrocytes, au niveau de l'ARNm et au niveau protéique est ainsi retrouvée dans divers troubles du système nerveux central

(Perez-Nievas et al., 2013). Nos résultats montrent une augmentation non significative de ce marqueur en qPCR, Western Blot et immunohistochimie en absence de DNF dans le modèle Tau KI à 16 mois. Les astrocytes hippocampiques dans la souris expriment de base un niveau plus élevé de GFAP que d'autres régions du cerveau et il semblerait que ces niveaux tendent à l'augmentation dans le modèle Tau KI à 16 mois. Ainsi, ces données suggèrent l'évolution vers une réactivité astrocytaire. D'une part, l'installation d'une réactivité précoce aux lésions peut contribuer à l'altération de la mémoire à court terme (Escartin et al., 2021). Un fonctionnement astrocytaire anormal peut contribuer à la perturbation du réseau neuronal et de la plasticité synaptique, et entraîner des troubles cognitifs (Ceyzériat et al., 2018; Santello et al., 2019). D'autre part, il est également possible que cette tendance soit un signe d'augmentation de la neuroinflammation, ce qui reste à être confirmé. Toutefois, bien que la GFAP soit un marqueur utile, il n'est pas suffisant pour discuter d'une réactivité astrocytaire et doit être complété par d'autres marqueurs (Vimentine ou S100 β). L'expression de la GFAP peut également être modulée par des stimuli physiologiques mais aussi par l'âge. En effet, les astrocytes subissent des changements morphologiques, une augmentation de la densité cellulaire mais aussi une augmentation de GFAP avec l'âge (H J Jyothi 2015).

2 Un nouveau modèle APPxTau *Knock-In*

Afin de potentialiser les troubles précoces et induire et/ou accélérer l'apparition d'agrégats de Tau dans le modèle Tau KI, nous avons choisi d'effectuer nos croisements avec le modèle APP^{NL-GF} KI (Saito et al., 2014). Le croisement avec ce modèle nous permet de nous affranchir de la surexpression de l'APP et de ces produits de catabolisme. Pour la suite du projet, nous avons choisi de travailler sur une cohorte composée de mâles et de femelles. Nous avons analysé les souris APPxTau issues des croisements et leurs contrôles à l'âge de 6 et 12 mois.

2.1 Potentiel effet antagoniste de Tau et A β au niveau métabolique

Si les modèles murins de la MA développent souvent un phénotype diabétique et des altérations métaboliques conséquentes (Vandal et al., 2015), et que des altérations de l'homéostasie du glucose sont observées dans le modèle Tau KI (Kraiem et al., 2022), les souris APPxTau quant à elles, présentent moins de masse grasse par rapport aux souris Tau KI, mais plus que les souris APP KI. Ainsi, la présence de lésions amyloïdes semble atténuer l'effet de la perte de fonction de Tau au niveau métabolique. Le profil métabolique sans normalisation par la masse maigre montre une hyperphagie nocturne associée à une balance énergétique plus excédentaire la nuit dans le modèle APPxTau. Le modèle APPxTau semble être un bon candidat à une expérience de *pair-feeding* qui consisterait à faire manger les souris APPxTau autant que les WT sur la période de nuit

pour voir s'il y a un gain de poids. Nous pourrions ainsi savoir si l'hyperphagie est seule responsable de cette modification de poids et de composition corporelle.

2.2 Effet potentialisateur de Tau et A β en absence d'agrégation de Tau

La suite de l'étude du modèle double mutant APPxTau a révélé une augmentation de la phosphorylation de Tau (pSer199, 396, 404) à 6 mois par rapport aux souris Tau KI, sans agrégation apparente, malgré la présence de la pathologie amyloïde, ce jusqu'à l'âge de 12 mois. Plusieurs études de croisements entre des lignées de surexpression ont révélé un effet potentialisateur sur la pathologie Tau préexistante par rapport aux lignées parentales comme pour les croisements des lignées Tg2576 avec le modèle JNPL3 (Tau P301S) ou encore le croisement de souris APP/PS1 avec la lignée inductible pour Tau rTg4510 (Lewis, 2001; Bennett et al., 2017). L'absence de la pathologie Tau dans le modèle APPxTau peut donc être reliée à une notion de temps, comme c'est le cas chez l'Homme, où il faut plusieurs décennies à l'amyloïdose pour induire une Tauopathie corticale et provoquer une neurodégénérescence (Bateman et al., 2012). Réciproquement, de plus larges plaques et une dystrophie neuritique accrue ont également été rapportés pour des croisements de souris APP/PS1 avec des souris rTg1221 (Jackson et al., 2016). En accord avec cette étude, nous observons une augmentation de la charge de plaques amyloïdes (avec en particulier des petites plaques) dans le modèle APPxTau, ce qui témoignerait donc d'une potentialisation mutuelle possible de la Tau humaine mutée avec la pathologie amyloïde.

2.3 Troubles précoces de la MA dans le modèle APPxTau

2.3.1 Effets de la perte de fonction de la protéine Tau sur la mémoire

Il est admis que Tau et A β contribuent ensemble à l'altération de la LTP qui conduit à l'altération de la formation de la mémoire à long terme dans la MA et les cas de MCI (Redondo and Morris, 2011; Shipton et al., 2011). Nos résultats de comportement montrent une altération de la mémoire à court et long terme dans le modèle APPxTau à 12 mois, de la même façon que dans les souris APP. Ces données suggèrent que la protéine Tau mutée n'influe pas sur le déclin cognitif à ce stade. De nombreuses études associent les troubles comportementaux à des défauts d'activité neuronale. De façon intéressante et dans ce sens, les résultats obtenus en séquençage d'ARNm indiquent une diminution d'IEGs, suggérant une hypoexcitabilité neuronale. Cette diminution pourrait ainsi contribuer aux troubles de la mémoire décelés dans nos modèles. Toutefois, des études cliniques ont montré que l'hyperexcitabilité neuronale hippocampique et corticale est une caractéristique trouvée chez les patients dans les stades précoces de la MA (Targa Dias Anastacio et al., 2022). Néanmoins, cette hyperexcitabilité évolue dans les stades tardifs en une hypoexcitabilité corrélée à la neurodégénérescence. De la même façon, une hyperactivité

hippocampique est aussi observée dans des cas de MCI ou de personnes âgées non atteintes de démence (Dickerson et al., 2005). De nombreuses études ont associé l'A β à une activité synaptique et neuronale aberrante. En utilisant des souris double mutantes pour Tau et A β , d'autres études ont montré que même si A β induit une hyperexcitabilité neuronale accrue, l'effet de Tau (en absence de DNF) est dominant et instaure l'inhibition de cette activité neuronale (Busche et al., 2019). Néanmoins, ces études sont en désaccord avec nos résultats qui montrent une hypoexcitabilité également chez les souris APP KI, de la même façon que chez les souris APPxTau et Tau KI, sans différence significative. Par ailleurs, une étude électrophysiologique dans ces modèles nous apporterait plus de précisions. Finalement, si les dépôts de Tau sont connus pour agir en aval de la pathologie amyloïde et corrélés avec le déclin cognitif dans la MA, la perte de fonction de Tau dans le modèle APPxTau est susceptible de renforcer les déficits de mémoire médiés par A β .

2.3.2 Effets de la perte de fonction de la protéine Tau sur l'anxiété et la locomotion

Les résultats indiqués précédemment concernant l'apprentissage et la mémoire ne montrent pas d'effet de la perte de fonction de Tau chez les souris APPxTau, à l'inverse de plusieurs études qui ont démontré que la réduction génétique de la protéine Tau endogène protège contre les phénotypes synaptiques, notamment les déficits de LTP, les crises épileptiques et les déficits de transport axonal (Roberson et al. 2007 ; Vossel et al. 2017). Toutefois et en accord avec ces études, certains paramètres semblent plutôt améliorés. En effet, l'analyse du comportement de type anxieux à l'aide de l'EPM (*elevated plus maze*) indique que les souris APPxTau sont moins désinhibées que les souris APP. Ceci pourrait s'expliquer par un rôle de Tau dans les mécanismes associés et médiés par A β . En effet, ce phénotype anxieux est également présent chez les souris Tau KI. Même si la perte de fonction de Tau ne semble pas avoir des effets inverses sur l'altération de la mémoire médiée par A β , nous avons observé de façon intéressante une diminution de l'hyperactivité locomotrice dans le modèle APPxTau par rapport aux souris APP en phase de nuit. Cette observation est en accord avec des études de délétion de Tau endogène dans des modèles de surexpression d'APP. Ces derniers suggèrent qu'A β peut affecter l'excitabilité neuronale et le phénotype comportemental par des mécanismes qui peuvent être Tau-dépendants et Tau-indépendants (Yoshikawa et al., 2018). Dans un même contexte de pathologie amyloïde, d'autres études ont montré que la suppression de Tau dans un modèle APP/PS1xrTg4510 a permis de réduire la phosphorylation de Tau, l'astroglie et de prévenir la perte neuronale (DeVos et al., 2018a). Il était par conséquent intéressant d'évaluer l'interaction de Tau et A β au niveau synaptique et glial en rapport avec les troubles cognitifs observés.

2.3.3 Dérégulations des marqueurs synaptiques médiés par Tau et A β

Pour mieux comprendre les mécanismes impactant l'apprentissage et la mémorisation, nous avons évalué les changements de protéines connues pour être impliquées dans la mémoire et la plasticité synaptique. En effet, certaines études suggèrent que les changements synaptiques sont un évènement central dans le processus de la MA, la perte synaptique étant un facteur à forte corrélation avec la mémoire et la cognition et donc l'installation de la démence (Spires-Jones and Hyman, 2014). Nous avons montré une diminution de l'expression des protéines pré-synaptiques dans le modèle APPxTau (Syntaxine-1 et SNAP25) qui pourrait conduire à des altérations synaptiques, et précéder la mort neuronale. En effet, si les protéines SNARE pré-synaptiques (T-SNARE) viennent à manquer, la fusion de la vésicule avec la membrane pré-synaptique peut être perturbée. La communication synaptique en serait diminuée et pourrait participer aux troubles mnésiques observés dans les souris APPxTau dans le test du labyrinthe en Y ainsi que le test de Barnes.

En ce qui concerne les protéines membranaires vésiculaires (VAMP-2, synaptogyrine-3), nous observons une tendance à l'augmentation des niveaux d'expression chez les APPxTau par rapport aux contrôles. La Synaptogyrine-3 entraîne l'association de la protéine Tau pré-synaptique aux vésicules synaptiques les rendant ainsi moins mobiles en condition pathologique, cette interaction est susceptible de contribuer au dysfonctionnement synaptique précoce dans les maladies neurodégénératives associées à la protéine Tau (McInnes et al., 2018). La protéine VAMP-2, composante des SNARE vésiculaires (V-SNARE) permet, par enchevêtrement avec les T-SNARE, la fusion de la vésicule avec la membrane pré-synaptique. Nous pouvons supposer que son augmentation témoignerait d'une augmentation du nombre de vésicules ou d'une augmentation des mécanismes de fusion. Nous pouvons imaginer que si les vésicules ne fusionnent pas avec la membrane pré-synaptique, elles pourraient s'accumuler au sein de la terminaison pré-synaptique du neurone.

Ces variations synaptiques sont finalement observées par analyse semi-quantitative en Western Blot. De plus, les homogénats analysés, obtenus à partir du cortex cérébral, contiennent les neurones dans leur totalité. Etant donné, que les protéines étudiées sont enrichies dans les synapses mais également présentes dans les autres compartiments neuronaux en plus faible quantité, cela peut empêcher de détecter certaines variations qui auraient lieu au niveau synaptique uniquement. Ainsi, il pourrait être intéressant d'effectuer un isolement des synaptosomes. Cependant, il est à noter que cette technique requiert une grande quantité de tissu. Nous pouvons aussi utiliser des colorants « FM dye » afin de visualiser les vésicules synaptiques et étudier leur activité et leur trafic à la suite d'un isolement de synaptosomes fonctionnels par

exemple. Ces résultats rejoignent certains travaux qui ont montré que la perte synaptique et l'activation gliale pouvaient précéder les enchevêtrements neurofibrillaires (Oddo et al., 2003; Yoshiyama et al., 2007).

2.3.4 La neuroinflammation associée à la pathologie pourrait précéder la pathologie Tau
Les changements synaptiques précoces observés peuvent contribuer à l'installation de la pathologie et pourraient aussi découler d'un processus inflammatoire par action des cellules gliales (Henstridge et al., 2019). Plusieurs études ont montré l'accumulation de cellules gliales autour des plaques séniles (McGeer et al., 1987), ce qui suggère un rôle important dans l'installation de la pathologie. La microglie est une des premières cellules immunitaires à être activée et recrutée au niveau du tissu lésé durant la réponse inflammatoire (Wyss-Coray and Rogers, 2012). L'activation de la microglie par A β ou APP entraîne également une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α), conduisant finalement à une réponse inflammatoire exacerbée dans la MA (Combs et al., 2001; Sajja et al., 2016). Nos résultats montrent en effet une augmentation des récepteurs inflammatoires (clec7a, Itgax), du facteur de nécrose tumorale (TNF α) ainsi que du marqueur du complément (c1qa) dans le cortex et l'hippocampe des souris APP et APPxTau et semblent donc être associés à la pathologie amyloïde. A 12 mois, nos résultats de qPCR révèlent une expression plus importante du facteur TNF α et de clec7A dans le modèle APPxTau dans l'hippocampe par rapport aux souris APP. clec7a est retrouvé parmi les gènes régulés dans la microglie associée aux plaques amyloïdes dans la MA, connus sous le nom de DAM (disease associated microglia) (Butovsky and Weiner, 2018). Ainsi, avec les dépôts d'A β , la microglie devient neurotoxique et exprime plusieurs cytokines inflammatoires comme TNF α et CCL3. Il a été démontré que TNF α peut potentialiser la réponse astrogliale, en stimulant le processus neuroinflammatoire (Hensley, 2010).

Les astrocytes sont également associés aux plaques amyloïdes dans la MA. Nos résultats montrent une augmentation des marqueurs astrocytaires tels que GFAP et la vimentine en corrélation avec la pathologie amyloïde dans le modèle APP et APPxTau. Les astrocytes réactifs sont également connus pour s'accumuler autour des plaques amyloïdes, encerclant les dépôts d'A β d'une façon qui rappelle la cicatrisation gliale (Wyss-Coray and Rogers, 2012). Nous avons pu évaluer ce recrutement glial par reconstitution 3D du milieu environnant les plaques amyloïdes. Les astrocytes semblaient être moins concentrés au niveau des plaques alors que la microglie formait des halos autour. En effet, si les cellules microgliales sont connues pour être extrêmement mobiles et dynamiques et donc migrer vers les coeurs denses des plaques, ces dernières peuvent ne pas modifier la distribution spatiale des astrocytes (Galea et al., 2015). L'expression de la protéine Tau

humaine ne semble pas affecter le recrutement glial autour des plaques amyloïdes dans le modèle APPxTau. En plus de ces gènes, d'autres gènes associés à l'immunité cérébrale sont également surexprimés et enrichis au niveau des astrocytes et de la microglie dans nos résultats de séquençage des ARN. Cet environnement pro-inflammatoire est donc susceptible de moduler la plasticité synaptique et agir sur l'aspect cognitif et la mémoire (Amor et al., 2010). En effet, des études en imagerie TEP fournissent des indications sur le processus inflammatoire au cours de la maladie FTLD-Tau selon laquelle la neuroinflammation précède la pathologie Tau (Lant et al., 2014). Cependant, l'analyse transcriptomique révèle un nombre de gènes dérégulés plus important chez les souris APP que chez les souris APPxTau, avec des enrichissements dans les voies de signalisation similaires. Ceci suggère encore une fois un effet de la perte de fonction de Tau au niveau transcriptionnel en normalisant l'expression de certains gènes.

2.3.5 Diminution du niveau d'expression de la protéine Tau dans les modèles Tau KI et APPxTau

L'insertion de la séquence de la protéine Tau humaine mutée dans le nouveau modèle Tau KI a causé une diminution de son niveau d'expression visible par les techniques de biochimie utilisées. Afin de connaître la raison de cette baisse, il pourrait être intéressant d'effectuer un séquençage du génome en 5'UTR de *Mapt*, une région impliquée dans la régulation génique. La diminution de l'expression de la protéine Tau humaine mutée pourrait contribuer à la diminution des effets néfastes de l'amyloïde dans les souris APPxTau par rapport aux souris contrôles (Yoshikawa et al., 2018). En effet, une faible disponibilité de Tau pourrait conduire à une faible quantité de Tau phosphorylée et phosphorylable. Ainsi, il semble qu'une quantité suffisante de Tau soit nécessaire pour que la pathologie amyloïde participe au développement de la pathologie Tau et exerce l'ensemble de ses fonctions délétères. Toutefois, il n'est pas à exclure que dans des souris plus âgées cette quantité ne soit pas suffisante pour conduire au développement de DNF et aux effets néfastes de l'amyloïde sur Tau et inversement. La protéine Tau murine physiologique est retrouvée au niveau des plaques neuritiques chez les souris APP (Saito et al., 2014). A l'inverse, la protéine Tau humaine mutée ne semble pas être recrutée dans les plaques neuritiques dans les souris APPxTau. Cela pourrait finalement être une conséquence de la baisse d'expression.

3 Potentiel de propagation de la protéine Tau humaine du modèle Tau KI

A défaut d'induire une pathologie Tau par l'amyloïde dans le modèle double mutant APPxTau, nous avons émis l'hypothèse que l'inoculation intra-hippocampique de lysats d'APP KI chez les souris Tau KI serait un autre moyen d'étudier l'interaction entre les deux lésions. A la différence des souris APPxTau, la quantité de Tau n'est pas diminuée dans les souris APP KI. Nos résultats indiquent que la présence de Tau mutée dans les souris APP KI n'augmente pas la pathologie

amyloïde, contrairement à ce qui est observé dans les souris APPxTau. Réciproquement, l'inoculation de lysats contenant de la Tau 1N4R mutée dans des souris développant une pathologie amyloïde n'a pas conduit à la formation de DNF. Il serait intéressant de regarder si la protéine Tau mutée est retrouvée au niveau des plaques neuritiques dans les souris APP KI inoculées. L'absence de formation de DNF pourrait s'expliquer par l'absence d'interaction entre la protéine Tau mutée et la protéine Tau murine présente dans le modèle APP KI. Toutefois, des études ont déjà montré que l'inoculation de protéines Tau humaines pouvait modifier le métabolisme de la protéine Tau murine chez l'hôte avec un dépôt de Tau 3R et 4R (Ferrer et al., 2020).

Par ailleurs, les travaux, effectués par le groupe de Saito dans un modèle exprimant les 6 isoformes de Tau humanisées dans le modèle APP KI, ont montré que la protéine Tau pathologique issue de cerveaux de patients atteints de la MA interagissait mieux avec la Tau humaine que la Tau murine *in vivo* par injections intracérébrales (Saito et al., 2019). Ceci pourrait signifier que la présence de la Tau murine est susceptible de retarder la formation d'agrégats de Tau et leur propagation dans le cerveau. Cela ne semble pas être le cas pour notre modèle Tau KI. En effet, l'inoculation de lysats issus de cerveaux atteints de la MA n'a pas montré d'interaction avec la Tau humaine mutée au bout d'un mois post-injection.

4 Limites de l'étude

Un 3^{ème} groupe de souris APPxTau âgées de 24 mois n'a pas pu être obtenu en raison de la crise sanitaire de la COVID-19. La cohorte de 12 mois est considérée d'âge moyen équivalent chez l'Humain à la quarantaine alors que la prévalence de la maladie chez l'humain se situe vers 65 ans, l'âge étant le premier facteur de risque des formes sporadiques de la MA (Flurkey et al., 2007). Nous n'avons donc pas pu laisser vieillir les animaux pour observer l'impact de l'âge. De plus, ces souris ont été difficiles à obtenir en raison de leur nature double homozygote. Le faible effectif obtenu au niveau des différents groupes étudiés, et surtout au niveau des mâles doubles homozygotes a rendu l'analyse des résultats plus difficile et moins significative. Ces facteurs constituent des limites importantes à notre étude. Nous pouvons supposer que le choix d'un âge assez précoce pour pouvoir détecter une pathologie Tau visible et des effets potentialisateurs évidents sur la Tau humaine dans le modèle APPxTau a probablement un effet sur les conclusions effectuées sur ce modèle. En effet, l'apparition de la pathologie Tau peut prendre plus de deux décennies après l'installation des lésions amyloïdes chez l'humain (Bateman et al., 2012). Il faut également 6 mois à l'amyloïde pour induire une pathologie Tau dans le modèle triple transgénique malgré la surexpression d'APP et Tau (Oddo et al., 2003).

De plus, aucune forme sporadique ou familiale de la MA n'est associée à une mutation au niveau du gène MAPT. Il est à noter que la séquence protéique de la Tau humaine et murine est identique à 88%. La Tau de souris n'est exprimée que sous la forme 4R et diffère de la Tau humaine spécialement en région N-terminale. De ce fait, les conclusions provenant de l'étude de ces modèles sont dépendantes de la combinaison de plusieurs facteurs mais aussi de l'analyse conjointe de la lignée transgénique et de la maladie humaine.

5 Avantages des modèles KI

Nos modèles Tau KI et APPxTau pourraient être utilisés afin de tester et valider des facteurs protecteurs et des facteurs aggravateurs qui interviennent dans la MA. Ceci peut permettre de déterminer les facteurs protecteurs qui permettent de maintenir la cognition pendant une longue période après le début des dépôts amyloïdes dans le cerveau chez l'Homme.

Les modèles transgéniques existants ont largement contribué à la compréhension de la MA. Les études réalisées dans ces modèles continueront de révéler des incohérences ou indiquer que certains résultats étaient finalement reliés à des artefacts de la surexpression. Ainsi, les modèles KI ont permis de résoudre certaines limitations liées à la surexpression. Il est vrai que ces modèles KI sont plus appropriés pour étudier les processus de la maladie avec des gènes cibles qui sont exprimés dans les bons types cellulaires, en quantité plus appropriée et sous le contrôle de promoteurs endogènes. Ces modèles peuvent être utilisés pour évaluer les effets de variants associés à la maladie dans des études d'association pangénomique GWAS (Reitz, 2015; Naj et al., 2017; Rojas, 2021; Bellenguez, 2022). Un consortium MODEL-AD (Model Organism Development and Evaluation for Late-onset Alzheimer's Disease) a été créé pour optimiser les données humaines et permettre d'identifier les gènes et les biomarqueurs de la MA. Une collaboration entre l'Université de l'Indiana (IU), le Laboratoire Jackson (JAX), la Faculté de médecine de l'Université de Pittsburgh (Pitt), SageBioNetworks (Sage) et l'Université de Californie, Irvine (UCI), servira à développer une ligne de conduite pour les tests précliniques par exemple (Oblak et al., 2020). Ainsi, la stratégie adoptée pour modéliser LOAD (*Late Onset Alzheimer's disease*) est de coupler l'humanisation des gènes critiques pour la MA comme APP et Tau avec des variants associés à la maladie dans des études d'association pangénomique GWAS (Trem2, ApoE 4...) pour générer des modèles de souris KI qui présentent des gènes reliés à la MA sur un fond génétique A β /Tau.

6 Perspectives générales

Certaines incohérences peuvent être observées dans la littérature, ceci serait dû aux différences dans les protocoles comportementaux utilisés, le type de tests effectués, l'âge des animaux, le fond

génétique de génération des animaux ou encore le cycle auquel ils sont soumis. De plus, les conditions environnementales, le changement de manipulateurs au cours d'une étude ainsi que l'heure de manipulation sont aussi des facteurs qui peuvent influencer les résultats des expériences (Bryan et al., 2009). Une éthique de partage et de comparaison des données et des outils ainsi qu'utiliser des modèles les plus adaptés et maximiser la réplication des résultats serait une optique primordiale à l'échelle globale de la recherche mais également sur la MA afin de maximiser le développement de médicaments améliorant les symptômes de la MA.

Finalement, les différences neuroanatomiques, génétiques et comportementales entre rongeurs et humains et notamment les différences entre les protéines clés de la MA au niveau de la séquence de Tau comme pour A β ou des isoformes exprimées comme pour Tau (Kaas, 2013; Nithianantharajah and Grant, 2013) sont des aspects critiques à contrôler. De la même façon, le système immunitaire cérébral est différent entre la souris et l'Humain. Il est vrai que, pour mon projet, je me suis particulièrement intéressée aux modèles murins mais il est également possible de modéliser certains aspects de la MA chez d'autres rongeurs tels que des modèles de rats ou l'*octodon degus* (Folkesson et al., 2007; Cuenca-Bermejo et al., 2020). Certains animaux comme le singe ou l'ours peuvent même développer spontanément des plaques amyloïdes ou des dégénérescences neurofibrillaires (Cork et al., 1988; Price et al., 1991). Les plaques amyloïdes ont aussi été observées chez le microcèbe. Le développement de modèles de primates non-humains pour la MA est une étape importante (Okano et al., 2016) pour se rapprocher de la maladie humaine et ainsi diminuer la barrière d'espèces et finir par limiter le temps et le coût du développement médicamenteux relié à la MA. L'utilisation de ce primate non-humain prend de plus en plus d'ampleur, une induction de la pathologie amyloïde et Tau dans ce modèle a récemment été démontrée (Lam et al., 2021).

Conclusion

Mon projet de thèse a permis de mettre au point un nouveau modèle humanisé KI (APPxTau KI) qui combine une expression physiologique des deux protéines principales impliquées dans la MA et qui présente des troubles précoces de la maladie, en croisant la souris Tau KI et la souris APP KI.

Comme prévu, le modèle Tau KI généré au laboratoire ne surexprime pas la protéine Tau humaine et semble présenter des caractéristiques précoces de Tauopathies, notamment des troubles du métabolisme et de la mémoire à court terme et une astroglie, sans agrégation visible de la protéine Tau. Les effets observés seraient liés à une perte de fonction de la protéine Tau.

Nous avons pu observer un effet de potentialisation mutuelle de la pathologie Tau et amyloïde chez les souris APPxTau KI, mais toujours en absence d'agrégats de Tau à l'âge de 12 mois. En effet, l'étude du modèle double mutant montre une expression de transgènes humains et de protéines correspondantes à des niveaux physiologiques avec une phosphorylation de Tau accrue dans le cortex ainsi qu'un nombre augmenté de plaques amyloïdes par rapport aux modèles simples mutants. Une neuroinflammation liée à la pathologie amyloïde a également été détectée dans le cortex et l'hippocampe. L'altération de la mémoire détectée est corrélée aux lésions amyloïdes. Celle-ci serait associée à une hypoexcitabilité neuronale chronique liée à l'expression de la protéine Tau humaine mutée mais également à une modification au niveau des protéines synaptiques. Nous n'avons malheureusement pas pu valider ces effets de potentialisation par inoculation intrahippocampique dans les cerveaux des souris simples mutantes. Il semblerait que l'expression de la protéine Tau humaine mutée ne soit pas suffisante pour conduire à la dégénérescence neurofibrillaire. Il se pourrait également que les périodes post-injections ainsi que l'âge des souris double mutantes étaient insuffisants pour observer une agrégation de la protéine Tau.

BIBLIOGRAPHIE

- Acquarone, E., Argyrousi, E. K., van den Berg, M., Gulisano, W., Fà, M., Staniszewski, A., et al. (2019). Synaptic and memory dysfunction induced by tau oligomers is rescued by up-regulation of the nitric oxide cascade. *Mol Neurodegeneration* 14, 26. doi: 10.1186/s13024-019-0326-4.
- Aguzzi, A., and Rajendran, L. (2009). The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids. *Neuron* 64, 783–790. doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.016.
- Ahmed, R. M., MacMillan, M., Bartley, L., Halliday, G. M., Kiernan, M. C., Hodges, J. R., et al. (2014a). Systemic metabolism in frontotemporal dementia. *Neurology* 83, 1812–1818. doi: 10.1212/WNL.0000000000000993.
- Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T. K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., et al. (2014b). A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: the pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathol* 127, 667–683. doi: 10.1007/s00401-014-1254-6.
- Ahmed, Z., Doherty, K. M., Silveira-Moriyama, L., Bandopadhyay, R., Lashley, T., Mamais, A., et al. (2011). Globular glial tauopathies (GGT) presenting with motor neuron disease or frontotemporal dementia: an emerging group of 4-repeat tauopathies. *Acta Neuropathol* 122, 415–428. doi: 10.1007/s00401-011-0857-4.
- Allan Butterfield, D. (2002). Amyloid β -peptide (1-42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. A Review. *Free Radical Research* 36, 1307–1313. doi: 10.1080/1071576021000049890.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., et al. (2002). Abundant Tau Filaments and Nonapoptotic Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Human P301S Tau Protein. *J. Neurosci.* 22, 9340–9351. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09340.2002.
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., De Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y.-A., et al. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms: Pathology of non-mutant tau in transgenic mice. *Journal of Neurochemistry* 86, 582–590. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01879.x.
- Arends, Y. M., Duyckaerts, C., Rozemuller, J. M., Eikelenboom, P., and Hauw, J.-J. (2000). Microglia, amyloid and dementia in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging* 21, 39–47. doi: 10.1016/S0197-4580(00)00094-4.
- Arendt, T., Brückner, M. K., Mosch, B., and Lösche, A. (2010). Selective Cell Death of Hyperploid Neurons in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology* 177, 15–20. doi: 10.2353/ajpath.2010.090955.
- Arevalo-Rodriguez, I., Smailagic, N., Roqué i Figuls, M., Ciapponi, A., Sanchez-Perez, E., Giannakou, A., et al. (2015). Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of Alzheimer's disease and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.CD010783.pub2.
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18, 1584–1593. doi: 10.1038/nn.4132.

- Ashton, N. J., Hye, A., Rajkumar, A. P., Leuzy, A., Snowden, S., Suárez-Calvet, M., et al. (2020). An update on blood-based biomarkers for non-Alzheimer neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 16, 265–284. doi: 10.1038/s41582-020-0348-0.
- Audouard, E., Houben, S., Masaracchia, C., Yilmaz, Z., Suain, V., Authelet, M., et al. (2016). High-Molecular-Weight Paired Helical Filaments from Alzheimer Brain Induces Seeding of Wild-Type Mouse Tau into an Argyrophilic 4R Tau Pathology in Vivo. *The American Journal of Pathology* 186, 2709–2722. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.06.008.
- Audouard, E., Van Hees, L., Suain, V., Yilmaz, Z., Poncelet, L., Leroy, K., et al. (2015). Motor Deficit in a Tauopathy Model Is Induced by Disturbances of Axonal Transport Leading to Dying-Back Degeneration and Denervation of Neuromuscular Junctions. *The American Journal of Pathology* 185, 2685–2697. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.011.
- Avila, J., Lucas, J. J., Pérez, M., and Hernández, F. (2004). Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiological Reviews* 84, 361–384. doi: 10.1152/physrev.00024.2003.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., et al. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Research* 477, 90–99. doi: 10.1016/0006-8993(89)91396-6.
- Bao, F., Wicklund, L., Lacor, P. N., Klein, W. L., Nordberg, A., and Marutle, A. (2012). Different β -amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity. *Neurobiology of Aging* 33, 825.e1-825.e13. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.003.
- Barger, S. W., and Harmon, A. D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388, 878–881. doi: 10.1038/42257.
- Barghorn, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E.-M., et al. (2000). Structure, Microtubule Interactions, and Paired Helical Filament Aggregation by Tau Mutants of Frontotemporal Dementias. *Biochemistry* 39, 11714–11721. doi: 10.1021/bi000850r.
- Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., et al. (2012). Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 367, 795–804. doi: 10.1056/NEJMoa1202753.
- Belarbi, K., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F.-J., Desmercierres, J., Troquier, L., Brouillette, J., 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. doi: 10.2174/156720511796717230.
- Bellenguez, C. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics* 54.
- 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. *The American Journal of Pathology* 165, 1643–1652. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63421-9.

- Benedict, C., and Grillo, C. A. (2018). Insulin Resistance as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease: A State-of-the-Art Review. *Front. Neurosci.* 12, 215. doi: 10.3389/fnins.2018.00215.
- Benhelli-Mokrani, H., Mansuroglu, Z., Chauderlier, A., Albaud, B., Gentien, D., Sommer, S., et al. (2018). Genome-wide identification of genic and intergenic neuronal DNA regions bound by Tau protein under physiological and stress conditions. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gky929.
- 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 Letters* 485, 87–93. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02203-1.
- Bennett, D. A., Schneider, J. A., Bienias, J. L., Evans, D. A., and Wilson, R. S. (2005). Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions. *Neurology* 64, 834–841. doi: 10.1212/01.WNL.0000152982.47274.9E.
- Bennett, R. E., DeVos, S. L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., et al. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *The American Journal of Pathology* 187, 1601–1612. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.03.011.
- Bero, A. W., Meng, J., Cho, S., Shen, A. H., Canter, R. G., Ericsson, M., et al. (2014). Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 11852–11857. doi: 10.1073/pnas.1408378111.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.-., 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. doi: 10.1016/0896-6273(93)90279-Z.
- Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., and Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet Neurology* 5, 64–74. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70284-2.
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., and LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.040.
- Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzig, M. C., Radde, R., Staufenbiel, M., et al. (2007). Induction of Tau Pathology by Intracerebral Infusion of Amyloid- β -Containing Brain Extract and by Amyloid- β Deposition in APP \times Tau Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology* 171, 2012–2020. doi: 10.2353/ajpath.2007.070403.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., et al. (1996). Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A β _{1–42}/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron* 17, 1005–1013. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80230-5.
- Borson, S., Scanlan, J. M., Chen, P., and Ganguli, M. (2003). The Mini-Cog as a Screen for Dementia: Validation in a Population-Based Sample: MINI-COG IN MOVIES. *Journal of the American Geriatrics Society* 51, 1451–1454. doi: 10.1046/j.1532-5415.2003.511465.x.

- Bose, K. S., and Sarma, R. H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem Biophys Res Commun* 66, 1173–1179. doi: 10.1016/0006-291x(75)90482-9.
- Bourgeois, A., Lauritzen, I., Lorivel, T., Bauer, C., Checler, F., and Pardossi-Piquard, R. (2018). Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3×TgAD and 2×TgAD mice. *Neurobiology of Aging* 71, 21–31. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038.
- Braak, F., Braak, H., and Mandelkow, E.-M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87, 554–567. doi: 10.1007/BF00293315.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Demonstration of Amyloid Deposits and Neurofibrillary Changes in Whole Brain Sections. *Brain Pathology* 1, 213–216. doi: 10.1111/j.1750-3639.1991.tb00661.x.
- Braak, H., Braak, E., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1986). Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: A third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neuroscience Letters* 65, 351–355. doi: 10.1016/0304-3940(86)90288-0.
- Bramblett, G. T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. Y. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10, 1089–1099. doi: 10.1016/0896-6273(93)90057-X.
- Brion, J. P., Couck, A. M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* 17, 89–96.
- Bronzuoli, M. R., Iacomino, A., Steardo, L., and Scuderi, C. (2016). Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *JIR Volume 9*, 199–208. doi: 10.2147/JIR.S86958.
- Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., and Robinson, S. R. (2018). The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 10, 118. doi: 10.3389/fnagi.2018.00118.
- Bryan, K. J., Lee, H., Perry, G., Smith, M. A., and Casadesus, G. (2009). "Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations," in *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* Frontiers in Neuroscience., ed. J. J. Buccafusco (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5231/> [Accessed July 18, 2022].
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders¹¹These authors contributed equally to this work. *Brain Research Reviews* 33, 95–130. doi: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9.
- Buée, L., Hof, P. R., Roberts, D. D., Delacourte, A., Morrison, J. H., and Fillit, H. M. (1992). Immunohistochemical identification of thrombospondin in normal human brain and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 141, 783–788.

- Buée-Scherer, V., Condamines, O., Mourton-Gilles, C., Jakes, R., Goedert, M., Pau, B., et al. (1996). AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research* 39, 79–88. doi: 10.1016/0169-328X(96)00003-4.
- Bukhari, H., Glotzbach, A., Kolbe, K., Leonhardt, G., Loosse, C., and Müller, T. (2017). Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 156, 189–213. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.05.005.
- Busche, M. A., and Hyman, B. T. (2020). Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 23, 1183–1193. doi: 10.1038/s41593-020-0687-6.
- Busche, M. A., Wegmann, S., Dujardin, S., Commins, C., Schiantarelli, J., Klickstein, N., et al. (2019). Tau impairs neural circuits, dominating amyloid- β effects, in Alzheimer models in vivo. *Nat Neurosci* 22, 57–64. doi: 10.1038/s41593-018-0289-8.
- Bussière, T., Hof, P. R., Mailliot, C., Brown, C. D., Caillet-Boudin, M. L., Perl, D. P., et al. (1999). Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathologica* 97, 221–230. doi: 10.1007/s004010050978.
- Butovsky, O., and Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19, 622–635. doi: 10.1038/s41583-018-0057-5.
- Cairns, N. J., Chadwick, A., Luthert, P. J., and Lantos, P. L. (1992). Astrocytosis, β A4-protein deposition and paired helical filament formation in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 112, 68–75. doi: 10.1016/0022-510X(92)90134-7.
- Calafate, S., Buist, A., Miskiewicz, K., Vijayan, V., Daneels, G., de Strooper, B., et al. (2015). Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Reports* 11, 1176–1183. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.043.
- Calsolaro, V., and Edison, P. (2016). Alterations in Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease. *EMI* 10, 31–39. doi: 10.2174/1872214810666160615102809.
- Cantarero-Prieto, D., Leon, P. L., Blazquez-Fernandez, C., Juan, P. S., and Cobo, C. S. (2020). The economic cost of dementia: A systematic review. *Dementia* 19, 2637–2657. doi: 10.1177/1471301219837776.
- Cantero, J. L., Hita-Yañez, E., Moreno-Lopez, B., Portillo, F., Rubio, A., and Avila, J. (2010). Tau Protein Role in Sleep-Wake Cycle. *JAD* 21, 411–421. doi: 10.3233/JAD-2010-100285.
- Carvalho, D. Z., St Louis, E. K., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Lowe, V. J., Roberts, R. O., et al. (2018). Association of Excessive Daytime Sleepiness With Longitudinal β -Amyloid Accumulation in Elderly Persons Without Dementia. *JAMA Neurol* 75, 672. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.0049.
- Casimiro, I., Stull, N. D., Tersey, S. A., and Mirmira, R. G. (2021). Phenotypic sexual dimorphism in response to dietary fat manipulation in C57BL/6J mice. *Journal of Diabetes and its Complications* 35, 107795. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2020.107795.

- Cataldo, A. M., and Nixon, R. A. (1990). Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3861–3865. doi: 10.1073/pnas.87.10.3861.
- Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., et al. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *acta neuropathol commun* 6, 104. doi: 10.1186/s40478-018-0606-1.
- Chandra, A., Dervenoulas, G., and Politis, M. (2019). Magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neurol* 266, 1293–1302. doi: 10.1007/s00415-018-9016-3.
- Chang, C.-W., Evans, M. D., Yu, X., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2021a). Tau reduction affects excitatory and inhibitory neurons differently, reduces excitation/inhibition ratios, and counteracts network hypersynchrony. *Cell Reports* 37, 109855. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109855.
- Chang, C.-W., Shao, E., and Mucke, L. (2021b). Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies. *Science* 371, eabb8255. doi: 10.1126/science.abb8255.
- Chang, E., Kim, S., Yin, H., Nagaraja, H. N., and Kuret, J. (2008). Pathogenic missense *MAPT* mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps. *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05692.x.
- Chang, K.-A., Kim, H.-S., Ha, T.-Y., Ha, J.-W., Shin, K. Y., Jeong, Y. H., et al. (2006). Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 Regulates the Nuclear Translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration. *Mol Cell Biol* 26, 4327–4338. doi: 10.1128/MCB.02393-05.
- Chatterjee, S., Cassel, R., Schneider-Anthony, A., Merienne, K., Cosquer, B., Tzeplaeff, L., et al. (2018). Reinstating plasticity and memory in a tauopathy mouse model with an acetyltransferase activator. *EMBO Mol Med* 10. doi: 10.15252/emmm.201708587.
- Chaudhary, A. R., Berger, F., Berger, C. L., and Hendricks, A. G. (2018). Tau directs intracellular trafficking by regulating the forces exerted by kinesin and dynein teams. *Traffic* 19, 111–121. doi: 10.1111/tra.12537.
- Chen, C.-D., Oh, S.-Y., Hinman, J. D., and Abraham, C. R. (2006). Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Neurochem* 97, 30–43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03705.x.
- Chen, F., Chen, H., Chen, Y., Wei, W., Sun, Y., Zhang, L., et al. (2021). Dysfunction of the SNARE complex in neurological and psychiatric disorders. *Pharmacological Research* 165, 105469. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105469.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–677. doi: 10.1038/360674a0.
- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Zhong, M., et al. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International* 60, 233–242. doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.013.

- Chen, W., Abud, E. A., Yeung, S. T., Lakatos, A., Nassi, T., Wang, J., et al. (2016). Increased tauopathy drives microglia-mediated clearance of beta-amyloid. *acta neuropathol commun* 4, 63. doi: 10.1186/s40478-016-0336-1.
- Cheng, G., Huang, C., Deng, H., and Wang, H. (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies: Diabetes and cognitive function. *Internal Medicine Journal* 42, 484–491. doi: 10.1111/j.1445-5994.2012.02758.x.
- 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. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.04.002.
- Cholerton, B., Baker, L. D., and Craft, S. (2013). Insulin, cognition, and dementia. *European Journal of Pharmacology* 719, 170–179. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.08.008.
- Cieplak, A. S. (2019). Tau Inclusions in Alzheimer's, Chronic Traumatic Encephalopathy and Pick's Disease. A Speculation on How Differences in Backbone Polarization Underlie Divergent Pathways of Tau Aggregation. *Front. Neurosci.* 13, 488. doi: 10.3389/fnins.2019.00488.
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., and Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* 32, 275–279. doi: 10.1007/s10072-010-0454-7.
- Cirrito, J. R., Kang, J.-E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., et al. (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58, 42–51. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.003.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., et al. (1992). Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 360, 672–674. doi: 10.1038/360672a0.
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R. A., Frank, S., Hench, J., et al. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 9535–9540. doi: 10.1073/pnas.1301175110.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11, 909–913. doi: 10.1038/ncb1901.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., et al. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8, 79–84. doi: 10.1038/nn1372.
- Collinge, J. (2016). Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases. *Nature* 539, 217–226. doi: 10.1038/nature20415.
- Collingwood, J. F., Chong, R. K. K., Kasama, T., Cervera-Gontard, L., Dunin-Borkowski, R. E., Perry, G., et al. (2008). Three-Dimensional Tomographic Imaging and Characterization of Iron Compounds within Alzheimer's Plaque Core Material. *JAD* 14, 235–245. doi: 10.3233/JAD-2008-14211.
- Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 441–468. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.

- Colton, C. A., and Wilcock, D. M. (2010). Assessing Activation States in Microglia. *CNSNDT* 9, 174–191. doi: 10.2174/187152710791012053.
- Combs, C. K., Karlo, J. C., Kao, S. C., and Landreth, G. E. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21, 1179–1188. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-04-01179.2001.
- Condello, C., and Stöehr, J. (2018). Aβ propagation and strains: Implications for the phenotypic diversity in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 109, 191–200. doi: 10.1016/j.nbd.2017.03.014.
- Coppede, F., and Migliore, L. (2009). DNA Damage and Repair in Alzheimers Disease. *CAR* 6, 36–47. doi: 10.2174/156720509787313970.
- Cork, L. C., Powers, R. E., Selkoe, D. J., Davies, P., Geyer, J. J., and Price, D. L. (1988). Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in Aged Bears: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 47, 629–641. doi: 10.1097/00005072-198811000-00006.
- Cowan, C. M., and Mudher, A. (2013). Are Tau Aggregates Toxic or Protective in Tauopathies? *Front. Neurol.* 4. doi: 10.3389/fneur.2013.00114.
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., et al. (2012). ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* 335, 1503–1506. doi: 10.1126/science.1217697.
- Cuenca-Bermejo, L., Pizzichini, E., Gonzalez-Cuello, A. M., De Stefano, M. E., Fernandez-Villalba, E., and Herrero, M.-T. (2020). Octodon degus: a natural model of multimorbidity for ageing research. *Ageing Research Reviews* 64, 101204. doi: 10.1016/j.arr.2020.101204.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., and Zhong, K. (2020). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *A&D Transl Res & Clin Interv* 6. doi: 10.1002/trc2.12050.
- Czajkowski, R., Jayaprakash, B., Wiltgen, B., Rogerson, T., Guzman-Karlsson, M. C., Barth, A. L., et al. (2014). Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8661–8666. doi: 10.1073/pnas.1313222111.
- Dawson, H. N., Cantillana, V., Jansen, M., Wang, H., Vitek, M. P., Wilcock, D. M., et al. (2010). Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 169, 516–531. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.037.
- de Bruijn, R. F., and Ikram, M. A. (2014). Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med* 12, 130. doi: 10.1186/s12916-014-0130-5.
- De Felice, F. G. (2013). Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *J. Clin. Invest.* 123, 531–539. doi: 10.1172/JCI64595.
- De Felice, F. G., Wu, D., Lambert, M. P., Fernandez, S. J., Velasco, P. T., Lacor, P. N., et al. (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by Aβ oligomers. *Neurobiology of Aging* 29, 1334–1347. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029.
- DeKosky, S. T., and Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 27, 457–464. doi: 10.1002/ana.410270502.

- Delacourte, A., and Buée, L. (1997). "Normal and Pathological Tau Proteins as Factors for Microtubule Assembly," in *International Review of Cytology* (Elsevier), 167–224. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62588-7.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Wattez, A., Maurage, C.-A., Lebert, F., et al. (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 398–407. doi: 10.1212/WNL.59.3.398.
- Demuro, A., Parker, I., and Stutzmann, G. E. (2010). Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* 285, 12463–12468. doi: 10.1074/jbc.R109.080895.
- Deshpande, A. (2006). Different Conformations of Amyloid beta Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience* 26, 6011–6018. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1189-06.2006.
- Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., Chambraud, B., et al. (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 9080–9085. doi: 10.1073/pnas.1708448114.
- DeVos, S. L., Corjuc, B. T., Commins, C., Dujardin, S., Bannan, R. N., Corjuc, D., et al. (2018a). Tau reduction in the presence of amyloid- β prevents tau pathology and neuronal death in vivo. *Brain* 141, 2194–2212. doi: 10.1093/brain/awy117.
- DeVos, S. L., Corjuc, B. T., Oakley, D. H., Nobuhara, C. K., Bannan, R. N., Chase, A., et al. (2018b). Synaptic Tau Seeding Precedes Tau Pathology in Human Alzheimer's Disease Brain. *Front Neurosci* 12, 267. doi: 10.3389/fnins.2018.00267.
- DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., et al. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci. Transl. Med.* 9, eaag0481. doi: 10.1126/scitranslmed.aag0481.
- Devred, F., Barbier, P., Lafitte, D., Landrieu, I., Lippens, G., and Peyrot, V. (2010). "Microtubule and MAPs," in *Methods in Cell Biology* (Elsevier), 449–480. doi: 10.1016/S0091-679X(10)95023-1.
- Dhenain, M., Lehericy, S., and Duyckaerts, C. (2002). Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale. *Med Sci (Paris)* 18, 697–708. doi: 10.1051/medsci/20021867697.
- Dickerson, B. C., Salat, D. H., Greve, D. N., Chua, E. F., Rand-Giovannetti, E., Rentz, D. M., et al. (2005). Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology* 65, 404–411. doi: 10.1212/01.wnl.0000171450.97464.49.
- Dickson, D. W., Crystal, H. A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., and Davies, P. (1995). Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of Aging* 16, 285–298. doi: 10.1016/0197-4580(95)00013-5.
- Dickson, D. W., Lee, S. C., Mattiace, L. A., Yen, S.-H. C., and Brosnan, C. (1993). Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7, 75–83. doi: 10.1002/glia.440070113.

- Dinkel, P. D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., and Margittai, M. (2011). Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry* 50, 4330–4336. doi: 10.1021/bi2004685.
- Duering, M., Grimm, M. O. W., Grimm, H. S., Schröder, J., and Hartmann, T. (2005). Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiology of Aging* 26, 785–788. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.002.
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Carrier, S., Lieger, S., et al. (2018). Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *acta neuropathol commun* 6, 132. doi: 10.1186/s40478-018-0637-7.
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., et al. (2014). Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. *PLoS ONE* 9, e100760. doi: 10.1371/journal.pone.0100760.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5–36. doi: 10.1007/s00401-009-0532-1.
- Duyckaerts, C., Potier, M.-C., and Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115, 5–38. doi: 10.1007/s00401-007-0312-8.
- Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Ando, K., Seilhean, D., Privat, N., Yilmaz, Z., et al. (2018). Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Abeta pathology. *Acta Neuropathol* 135, 201–212. doi: 10.1007/s00401-017-1791-x.
- Eisele, Y. S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S. A., Wolburg, H., et al. (2010). Peripherally Applied A β -Containing Inoculates Induce Cerebral β -Amyloidosis. *Science* 330, 980–982. doi: 10.1126/science.1194516.
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., et al. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24, 312–325. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
- Espíndola, S. L., Damianich, A., Alvarez, R. J., Sartor, M., Belforte, J. E., Ferrario, J. E., et al. (2018). Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Cell Reports* 23, 709–715. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.079.
- Farah, C. A., Perreault, S., Liazoghli, D., Desjardins, M., Anton, A., Lauzon, M., et al. (2006). Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 710–724. doi: 10.1002/cm.20157.
- Fein, J. A., Sokolow, S., Miller, C. A., Vinters, H. V., Yang, F., Cole, G. M., et al. (2008). Co-Localization of Amyloid Beta and Tau Pathology in Alzheimer's Disease Synaptosomes. *The American Journal of Pathology* 172, 1683–1692. doi: 10.2353/ajpath.2008.070829.
- Feng, W., and Zhang, M. (2009). Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* 10, 87–99. doi: 10.1038/nrn2540.

- Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R., and De Felice, F. G. (2014). Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 10. doi: 10.1016/j.jalz.2013.12.010.
- Ferrer, I., Zelaya, M. V., Aguiló García, M., Carmona, M., López-González, I., Andrés-Benito, P., et al. (2020). Relevance of host tau in tau seeding and spreading in tauopathies. *Brain Pathol* 30, 298–318. doi: 10.1111/bpa.12778.
- Ferretti, L., McCurry, S. M., Logsdon, R., Gibbons, L., and Teri, L. (2001). Anxiety and Alzheimer's Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 14, 52–58. doi: 10.1177/089198870101400111.
- Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santuccione Chadha, A., et al. (2018). Sex differences in Alzheimer disease — the gateway to precision medicine. *Nat Rev Neurol* 14, 457–469. doi: 10.1038/s41582-018-0032-9.
- Feyt, C., Pierrot, N., Tasiaux, B., Van Hees, J., Kienlen-Campard, P., Courtoy, P. J., et al. (2007). Phosphorylation of APP695 at Thr668 decreases γ -cleavage and extracellular A β . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357, 1004–1010. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.036.
- Fischer, D., Mukrasch, M. D., von Bergen, M., Klos-Witkowska, A., Biernat, J., Griesinger, C., et al. (2007). Structural and Microtubule Binding Properties of Tau Mutants of Frontotemporal Dementias. *Biochemistry* 46, 2574–2582. doi: 10.1021/bi061318s.
- Flaten, V., Laurent, C., Coelho, J. E., Sandau, U., Batalha, V. L., Burnouf, S., et al. (2014). From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer's disease? *Biochemical Society Transactions* 42, 587–592. doi: 10.1042/BST20130229.
- Flurkey, K., Mcurrer, J., and Harrison, D. (2007). "Mouse Models in Aging Research," in *The Mouse in Biomedical Research* (Elsevier), 637–672. doi: 10.1016/B978-012369454-6/50074-1.
- Folkesson, R., Malkiewicz, K., Kloskowska, E., Nilsson, T., Popova, E., Bogdanovic, N., et al. (2007). A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 777–782. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.195.
- Fu, H., Possenti, A., Freer, R., Nakano, Y., Hernandez Villegas, N. C., Tang, M., et al. (2019). A tau homeostasis signature is linked with the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology. *Nat Neurosci* 22, 47–56. doi: 10.1038/s41593-018-0298-7.
- Gabriele, R. M. C., Abel, E., Fox, N. C., Wray, S., and Arber, C. (2022). Knockdown of Amyloid Precursor Protein: Biological Consequences and Clinical Opportunities. *Front. Neurosci* 16, 835645. doi: 10.3389/fnins.2022.835645.
- Galea, E., Morrison, W., Hudry, E., Arbel-Ornath, M., Bacskai, B. J., Gómez-Isla, T., et al. (2015). Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- β plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15556–15561. doi: 10.1073/pnas.1516779112.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Borthette, P., Blackwell, C., et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527. doi: 10.1038/373523a0.

- Gauthier, S., Reisberg, B., Zaudig, M., Petersen, R. C., Ritchie, K., Broich, K., et al. (2006). Mild cognitive impairment. *The Lancet* 367, 1262–1270. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68542-5.
- Geslani, D. M., Tierney, M. C., Herrmann, N., and Szalai, J. P. (2005). Mild Cognitive Impairment: An Operational Definition and Its Conversion Rate to Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19, 383–389. doi: 10.1159/000084709.
- Giedraitis, V., Sundelöf, J., Irizarry, M. C., Gårevik, N., Hyman, B. T., Wahlund, L.-O., et al. (2007). The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 427, 127–131. doi: 10.1016/j.neulet.2007.09.023.
- Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., et al. (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 29, 10582–10587. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009.
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885–890. doi: 10.1016/S0006-291X(84)80190-4.
- Goedert, M., and Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1739, 240–250. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.08.007.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., and Crowther, R. A. (1992). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1983–1987. doi: 10.1073/pnas.89.5.1983.
- Goetzl, E. J., Mustapic, M., Kapogiannis, D., Eitan, E., Lobach, I. V., Goetzl, L., et al. (2016). Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *FASEBj*. 30, 3853–3859. doi: 10.1096/fj.201600756R.
- Gómez-Isla, T., Price, J. L., McKeel Jr., D. W., Morris, J. C., Growdon, J. H., and Hyman, B. T. (1996). Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-14-04491.1996.
- Gomez-Murcia, V., Sandau, U., Ferry, B., Parrot, S., Laurent, C., Basquin, M., et al. (2020). Hyperexcitability and seizures in the THY-Tau22 mouse model of tauopathy. *Neurobiology of Aging* 94, 265–270. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.06.004.
- Gonatas, N. K., Anderson, W., and Evangelista, I. (1967). The Contribution of Altered Synapses in the Senile Plaque: An Electron Microscopic Study in Alzheimer's Dementia * †. *J Neuropathol Exp Neurol* 26, 25–39. doi: 10.1097/00005072-196701000-00003.
- Gosztyla, M. L., Brothers, H. M., and Robinson, S. R. (2018). Alzheimer's Amyloid- β is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *JAD* 62, 1495–1506. doi: 10.3233/JAD-171133.
- Gotz, J. (2001). Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by Abeta 42 Fibrils. *Science* 293, 1491–1495. doi: 10.1126/science.1062097.

- Götz, J., Chen, F., Barmettler, R., and Nitsch, R. M. (2001). Tau Filament Formation in Transgenic Mice Expressing P301L Tau. *Journal of Biological Chemistry* 276, 529–534. doi: 10.1074/jbc.M006531200.
- Götz, J., Halliday, G., and Nisbet, R. M. (2019). Molecular Pathogenesis of the Tauopathies. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14, 239–261. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012936.
- Gouras, G. K., Tampellini, D., Takahashi, R. H., and Capetillo-Zarate, E. (2010). Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 119, 523–541. doi: 10.1007/s00401-010-0679-9.
- Gratuze, M., Joly-Amado, A., Vieau, D., Buée, L., and Blum, D. (2018). Mutual Relationship between Tau and Central Insulin Signalling: Consequences for AD and Tauopathies? *Neuroendocrinology* 107, 181–195. doi: 10.1159/000487641.
- Grignon, Y., Duyckaerts, C., Benneceb, M., and Hauw, J.-J. (1998). Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 95, 395–406. doi: 10.1007/s004010050816.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4913–4917. doi: 10.1073/pnas.83.13.4913.
- Gu, Y., Oyama, F., and Ihara, Y. (2002). τ Is Widely Expressed in Rat Tissues. *Journal of Neurochemistry* 67, 1235–1244. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x.
- Gulisano, W., Melone, M., Ripoli, C., Tropea, M. R., Li Puma, D. D., Giunta, S., et al. (2019). Neuromodulatory Action of Picomolar Extracellular A β 2 Oligomers on Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Synaptic Function and Memory. *J. Neurosci.* 39, 5986–6000. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0163-19.2019.
- Güntert, A., Döbeli, H., and Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461–475. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.027.
- Guo, J. L., Narasimhan, S., Changolkar, L., He, Z., Stieber, A., Zhang, B., et al. (2016). Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *Journal of Experimental Medicine* 213, 2635–2654. doi: 10.1084/jem.20160833.
- Haan, M. N. (2006). Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 159–166. doi: 10.1038/ncpneuro0124.
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (1993). Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* 75, 1039–1042. doi: 10.1016/0092-8674(93)90312-E.
- Habchi, J., Tompa, P., Longhi, S., and Uversky, V. N. (2014). Introducing Protein Intrinsic Disorder. *Chem. Rev.* 114, 6561–6588. doi: 10.1021/cr400514h.
- Habib, A., Sawmiller, D., Li, S., Xiang, Y., Rongo, D., Tian, J., et al. (2021). Retraction Note to: LISPRO mitigates β -amyloid and associated pathologies in Alzheimer's mice. *Cell Death Dis* 12, 1142. doi: 10.1038/s41419-021-04444-7.

- Hall, J., Thomas, K. L., and Everitt, B. J. (2001). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21, 2186–2193. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-06-02186.2001.
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., et al. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141, 1917–1933. doi: 10.1093/brain/awy132.
- Hanger, D. P., Brion, J. P., Gallo, J. M., Cairns, N. J., Luthert, P. J., and Anderton, B. H. (1991). Tau in Alzheimer's disease and Down's syndrome is insoluble and abnormally phosphorylated. *Biochemical Journal* 275, 99–104. doi: 10.1042/bj2750099.
- Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M. J., Seereeram, A., et al. (2007). Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 282, 23645–23654. doi: 10.1074/jbc.M703269200.
- Hardy, J. (1992). An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences* 15, 200–201. doi: 10.1016/0166-2236(92)90033-5.
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 256, 184–185. doi: 10.1126/science.1566067.
- Hartnell, I. J., Blum, D., Nicoll, J. A. R., Dorothee, G., and Boche, D. (2021). Glial cells and adaptive immunity in frontotemporal dementia with tau pathology. *Brain* 144, 724–745. doi: 10.1093/brain/awaa457.
- Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Lee, V. M.-Y., Ihara, Y., and Goedert, M. (1996). Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Letters* 384, 25–30. doi: 10.1016/0014-5793(96)00271-2.
- Hatch, R. J., Wei, Y., Xia, D., and Götz, J. (2017). Hyperphosphorylated tau causes reduced hippocampal CA1 excitability by relocating the axon initial segment. *Acta Neuropathol* 133, 717–730. doi: 10.1007/s00401-017-1674-1.
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., et al. (2018). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature Medicine* 24, 29–38. doi: 10.1038/nm.4443.
- Hensley, K. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Pathologic Consequences, and Potential for Therapeutic Manipulation. *JAD* 21, 1–14. doi: 10.3233/JAD-2010-1414.
- Henstridge, C. M., Tzioras, M., and Paolicelli, R. C. (2019). Glial Contribution to Excitatory and Inhibitory Synapse Loss in Neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 63. doi: 10.3389/fncel.2019.00063.
- Higuchi, M. (2005). Axonal Degeneration Induced by Targeted Expression of Mutant Human Tau in Oligodendrocytes of Transgenic Mice That Model Glial Tauopathies. *Journal of Neuroscience* 25, 9434–9443. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2691-05.2005.

- Ho, K.-H., Yang, X., Osipovich, A. B., Cabrera, O., Hayashi, M. L., Magnuson, M. A., et al. (2020). Glucose Regulates Microtubule Disassembly and the Dose of Insulin Secretion via Tau Phosphorylation. *Diabetes* 69, 1936–1947. doi: 10.2337/db19-1186.
- Ho, L., Qin, W., Pompl, P. N., Xiang, Z., Wang, J., Zhao, Z., et al. (2004). Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB j.* 18, 902–904. doi: 10.1096/fj.03-0978fje.
- Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4, 97–100. doi: 10.1038/nm0198-097.
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., et al. (2008). Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *The Lancet* 372, 216–223. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61075-2.
- Holsinger, R. M. D., McLean, C. A., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Evin, G. (2002). Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51, 783–786. doi: 10.1002/ana.10208.
- Holstege, H., Hulsman, M., Charbonnier, C., Grenier-Boley, B., Quenez, O., Grozeva, D., et al. (2022). Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as risk factors for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 54, 1786–1794. doi: 10.1038/s41588-022-01208-7.
- Hopp, S. C., Lin, Y., Oakley, D., Roe, A. D., DeVos, S. L., Hanlon, D., et al. (2018). The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 15, 269. doi: 10.1186/s12974-018-1309-z.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., et al. (1996). Correlative Memory Deficits, A β Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* 274, 99–103. doi: 10.1126/science.274.5284.99.
- Hua, Q., He, R.-Q., Haque, N., Qu, M.-H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., et al. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60, 413–421. doi: 10.1007/s000180300034.
- 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. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Ikegami, S. (2000). Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neuroscience Letters* 279, 129–132. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00964-7.
- Ishida, A., Furukawa, K., Keller, J. N., and Mattson, M. P. (1997). Secreted form of β -amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices: *NeuroReport* 8, 2133–2137. doi: 10.1097/00001756-199707070-00009.
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., et al. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 575, 669–673. doi: 10.1038/s41586-019-1769-z.

- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., et al. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* 142, 387–397. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036.
- Jack, C. R., Petersen, R. C., Xu, Y., O'Brien, P. C., Smith, G. E., Ivnik, R. J., et al. (2000). Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. *Neurology* 55, 484–490. doi: 10.1212/WNL.55.4.484.
- Jackson, R. J., Rudinskiy, N., Herrmann, A. G., Croft, S., Kim, J. M., Petrova, V., et al. (2016). Human tau increases amyloid β plaque size but not amyloid β -mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 44, 3056–3066. doi: 10.1111/ejn.13442.
- Jicha, G. A., Bowser, R., Kazam, I. G., and Davies, P. (1997). Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J. Neurosci. Res.* 48, 128–132. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19970415)48:2<128::AID-JNR5>3.0.CO;2-E.
- Jin, S. C., Carrasquillo, M. M., Benitez, B. A., Skorupa, T., Carrell, D., Patel, D., et al. (2015). TREM2 is associated with increased risk for Alzheimer's disease in African Americans. *Mol Neurodegeneration* 10, 19. doi: 10.1186/s13024-015-0016-9.
- Jolival, C. G., Lee, C. A., Beiswenger, K. K., Smith, J. L., Orlov, M., Torrance, M. A., et al. (2008). Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: Parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J. Neurosci. Res.* 86, 3265–3274. doi: 10.1002/jnr.21787.
- Jucker, M., and Walker, L. C. (2011). Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol.* 70, 532–540. doi: 10.1002/ana.22615.
- Kaas, J. H. (2013). The evolution of brains from early mammals to humans. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 4, 33–45. doi: 10.1002/wcs.1206.
- Kane, M. D., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Schwarz, R. D., et al. (2000). Evidence for Seeding of β -Amyloid by Intracerebral Infusion of Alzheimer Brain Extracts in β -Amyloid Precursor Protein-Transgenic Mice. *J. Neurosci.* 20, 3606–3611. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-10-03606.2000.
- Karch, C. M., and Goate, A. M. (2015). Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry* 77, 43–51. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
- Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H.-M., Nachman, E., et al. (2018). Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Reports* 23, 2039–2055. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.056.
- Kaufman, S. K., Sanders, D. W., Thomas, T. L., Ruchinskas, A. J., Vaquer-Alicea, J., Sharma, A. M., et al. (2016). Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron* 92, 796–812. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.055.
- Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., and Pacini, G. (2016). Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews* 37, 278–316. doi: 10.1210/er.2015-1137.

- Kazim, S. F., Blanchard, J., Dai, C.-L., Tung, Y.-C., LaFerla, F. M., Iqbal, I.-G., et al. (2014). Disease modifying effect of chronic oral treatment with a neurotrophic peptidergic compound in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 71, 110–130. doi: 10.1016/j.nbd.2014.07.001.
- Kazim, S. F., Seo, J. H., Bianchi, R., Larson, C. S., Sharma, A., Wong, R. K. S., et al. (2021). Neuronal Network Excitability in Alzheimer's Disease: The Puzzle of Similar versus Divergent Roles of Amyloid β and Tau. *eNeuro* 8, ENEURO.0418-20.2020. doi: 10.1523/ENEURO.0418-20.2020.
- 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. doi: 10.1126/science.aat1780.
- Kent, S. A., Spires-Jones, T. L., and Durrant, C. S. (2020). The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol* 140, 417–447. doi: 10.1007/s00401-020-02196-w.
- Killin, L. O. J., Starr, J. M., Shiue, I. J., and Russ, T. C. (2016). Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr* 16, 175. doi: 10.1186/s12877-016-0342-y.
- Kimura, T., Ishiguro, K., and Hisanaga, S. (2014). Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fnmol.2014.00065.
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., and Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4, 575–590. doi: 10.1016/j.trci.2018.06.014.
- Klein, C., Krämer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R., and Trotter, J. (2002). Process Outgrowth of Oligodendrocytes Is Promoted by Interaction of Fyn Kinase with the Cytoskeletal Protein Tau. *J. Neurosci.* 22, 698–707. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00698.2002.
- Klunk, W. E., Mathis, C. A., Price, J. C., DeKosky, S. T., Lopresti, B. J., Tsopelas, N. D., et al. (2009). "Amyloid Imaging with PET in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Clinically Unimpaired Subjects," in *PET in the Evaluation of Alzheimer's Disease and Related Disorders*, ed. D. Silverman (New York, NY: Springer New York), 119–147. doi: 10.1007/978-0-387-76420-7_6.
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., and Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, 1–13. doi: 10.1155/2012/731526.
- 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. doi: 10.1074/jbc.268.24374-84.
- Kovacs, G. G., Ghetti, B., and Goedert, M. (2022). Classification of diseases with accumulation of Tau protein. *Neuropathology Appl Neurobiol* 48. doi: 10.1111/nan.12792.

- Kovacs, G. G., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2017). Protein astroglial pathologies in human neurodegenerative diseases and aging: Protein astroglial pathologies. *Brain Pathology* 27, 675–690. doi: 10.1111/bpa.12536.
- Kraft, A. W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., et al. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J.* 27, 187–198. doi: 10.1096/fj.12-208660.
- Kraiem, S., Benderradji, H., Courty, E., Eddarkaoui, S., Bourouh, C., Faivre, E., et al. (2022). Impaired Glucose Homeostasis in a Tau Knock-In Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.* 15, 841892. doi: 10.3389/fnmol.2022.841892.
- Krstic, D., and Knuesel, I. (2013). Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 9, 25–34. doi: 10.1038/nrneurol.2012.236.
- Kruman, I. I., Wersto, R. P., Cardozo-Pelaez, F., Smilenov, L., Chan, S. L., Chrest, F. J., et al. (2004). Cell Cycle Activation Linked to Neuronal Cell Death Initiated by DNA Damage. *Neuron* 41, 549–561. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00017-0.
- Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., et al. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020–3032. doi: 10.1038/emboj.2010.167.
- Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., et al. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J* 29, 3408–3420. doi: 10.1038/emboj.2010.211.
- La Rue, A. (2010). Healthy Brain Aging: Role of Cognitive Reserve, Cognitive Stimulation, and Cognitive Exercises. *Clinics in Geriatric Medicine* 26, 99–111. doi: 10.1016/j.cger.2009.11.003.
- Lai, W., Wu, J., Zou, X., Xie, J., Zhang, L., Zhao, X., et al. (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. doi: 10.1021/pr300895r.
- Lam, S., Petit, F., Hérard, A.-S., Boluda, S., Eddarkaoui, S., Guillermier, M., et al. (2021). Transmission of amyloid-beta and tau pathologies is associated with cognitive impairments in a primate. *acta neuropathol commun* 9, 165. doi: 10.1186/s40478-021-01266-8.
- Lambert, J.-C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45, 1452–1458. doi: 10.1038/ng.2802.
- Lambrechts, A., Kwiatkowski, A. V., Lanier, L. M., Bear, J. E., Vandekerckhove, J., Ampe, C., et al. (2000). cAMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of EVL, a Mena/VASP Relative, Regulates Its Interaction with Actin and SH3 Domains. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36143–36151. doi: 10.1074/jbc.M006274200.
- Lane, D. J. R., Ayton, S., and Bush, A. I. (2018). Iron and Alzheimer's Disease: An Update on Emerging Mechanisms. *JAD* 64, S379–S395. doi: 10.3233/JAD-179944.
- Lant, S. B., Robinson, A. C., Thompson, J. C., Rollinson, S., Pickering-Brown, S., Snowden, J. S., et al. (2014). Patterns of microglial cell activation in frontotemporal lobar degeneration:

- Microglia and frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 686–696. doi: 10.1111/nan.12092.
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., and Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegeneration* 6, 39. doi: 10.1186/1750-1326-6-39.
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G. R., et al. (2012). Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEBj*. 26, 1946–1959. doi: 10.1096/fj.11-199851.
- Leboucher, A., Ahmed, T., Caron, E., Tailleux, A., Raison, S., Joly-Amado, A., et al. (2019). Brain insulin response and peripheral metabolic changes in a Tau transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease* 125, 14–22. doi: 10.1016/j.nbd.2019.01.008.
- Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F.-J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., et al. (n.d.). Detrimental Effects of Diet-Induced Obesity on t Pathology Are Independent of Insulin Resistance in t Transgenic Mice. *2012*, 8. doi: 10.2337/db12-0866.
- Lebouvier, T., Pasquier, F., and Buée, L. (2017). Update on tauopathies: *Current Opinion in Neurology* 30, 589–598. doi: 10.1097/WCO.0000000000000502.
- Lee, Y. B., Nagai, A., and Kim, S. U. (2002). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J. Neurosci. Res.* 69, 94–103. doi: 10.1002/jnr.10253.
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. I., Spoerri, L., Ciccotosto, G. D., Wright, D. K., et al. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med* 18, 291–295. doi: 10.1038/nm.2613.
- Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., et al. (2003). Enhanced Proteolysis of β -Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology, and Premature Death. *Neuron* 40, 1087–1093. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00787-6.
- Leroux, E., Perbet, R., Caillierez, R., Richetin, K., Lieger, S., Espourteille, J., et al. (2022). Extracellular vesicles: Major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies. *Molecular Therapy* 30, 782–797. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.09.020.
- Leroy, K., Ando, K., Laporte, V., Dedecker, R., Suain, V., Authalet, M., et al. (2012). Lack of Tau Proteins Rescues Neuronal Cell Death and Decreases Amyloidogenic Processing of APP in APP/PS1 Mice. *The American Journal of Pathology* 181, 1928–1940. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.012.
- Lesburguères, E., Gobbo, O. L., Alaux-Cantin, S., Hambucken, A., Trifilieff, P., and Bontempi, B. (2011). Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. *Science* 331, 924–928. doi: 10.1126/science.1196164.
- Lewis, J. (2001). Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science* 293, 1487–1491. doi: 10.1126/science.1058189.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., et al. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics* 25, 402–405. doi: 10.1038/78078.

- Li, J., Deng, J., Sheng, W., and Zuo, Z. (2012). Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 101, 564–574. doi: 10.1016/j.pbb.2012.03.002.
- Li, X., Leng, S., and Song, D. (2015). Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *CIA*, 549. doi: 10.2147/CIA.S74042.
- Li, Z., Hall, A. M., Kelinske, M., and Roberson, E. D. (2014). Seizure resistance without parkinsonism in aged mice after tau reduction. *Neurobiology of Aging* 35, 2617–2624. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.001.
- Li, Z., Shue, F., Zhao, N., Shinohara, M., and Bu, G. (2020). APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* 15, 63. doi: 10.1186/s13024-020-00413-4.
- Liu, H., Leak, R. K., and Hu, X. (2016). Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke Vasc Neurol* 1, 52–58. doi: 10.1136/svn-2016-000012.
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., et al. (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* 7, e31302. doi: 10.1371/journal.pone.0031302.
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., et al. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet* 390, 2673–2734. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31363-6.
- Lleó, A., Núñez-Llaves, R., Alcolea, D., Chiva, C., Balateu-Paños, D., Colom-Cadena, M., et al. (2019). Changes in Synaptic Proteins Precede Neurodegeneration Markers in Preclinical Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *Molecular & Cellular Proteomics* 18, 546–560. doi: 10.1074/mcp.RA118.001290.
- Llorens-Martín, M., Jurado, J., Hernández, F., and Avila, J. (2014). GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front. Mol. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fnmol.2014.00046.
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., and Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8422–8426. doi: 10.1073/pnas.87.21.8422.
- Ma, Q.-L., Zuo, X., Yang, F., Ubeda, O. J., Gant, D. J., Alaverdyan, M., et al. (2014). Loss of MAP Function Leads to Hippocampal Synapse Loss and Deficits in the Morris Water Maze with Aging. *Journal of Neuroscience* 34, 7124–7136. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3439-13.2014.
- Maesako, M., Uemura, K., Kubota, M., Kuzuya, A., Sasaki, K., Asada, M., et al. (2012). Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 33, 1011.e11-1011.e23. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.028.
- Maïo, I., Barbier, P., Allegro, D., Brault, C., and Peyrot, V. (2014). Quantitative Analysis of Tau-Microtubule Interaction Using FRET. *IJMS* 15, 14697–14714. doi: 10.3390/ijms150814697.
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P. W., et al. (2009). Brain Region-Specific Gene Expression Activation Required for Reconsolidation and Extinction of Contextual Fear Memory. *Journal of Neuroscience* 29, 402–413. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4639-08.2009.

- Manczak, M., and Reddy, P. H. (2013). Abnormal interaction of oligomeric amyloid- β with phosphorylated tau: implications to synaptic dysfunction and neuronal damage. *J Alzheimers Dis* 36, 285–295. doi: 10.3233/JAD-130275.
- Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 72–81. doi: 10.1016/0955-0674(95)80047-6.
- Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006247–a006247. doi: 10.1101/cshperspect.a006247.
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., et al. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Sci Rep* 6, 33047. doi: 10.1038/srep33047.
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., et al. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *Journal of Experimental Medicine* 214, 2257–2269. doi: 10.1084/jem.20161731.
- Marcus, C., Mena, E., and Subramaniam, R. M. (2014). Brain PET in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Clinical Nuclear Medicine* 39, e413–e426. doi: 10.1097/RLU.0000000000000547.
- Marinković, P., Blumenstock, S., Goltstein, P. M., Korzhova, V., Peters, F., Knebl, A., et al. (2019). *In vivo* imaging reveals reduced activity of neuronal circuits in a mouse tauopathy model. *Brain* 142, 1051–1062. doi: 10.1093/brain/awz035.
- Martin, L., Latypova, X., and Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 58, 458–471. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.023.
- Martini-Stoica, H., Cole, A. L., Swartzlander, D. B., Chen, F., Wan, Y.-W., Bajaj, L., et al. (2018). TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *Journal of Experimental Medicine* 215, 2355–2377. doi: 10.1084/jem.20172158.
- Masuda, A., Kobayashi, Y., Kogo, N., Saito, T., Saido, T. C., and Itohara, S. (2016). Cognitive deficits in single App knock-in mouse models. *Neurobiology of Learning and Memory* 135, 73–82. doi: 10.1016/j.nlm.2016.07.001.
- Matsuzaki, T., Sasaki, K., Tanizaki, Y., Hata, J., Fujimi, K., Matsui, Y., et al. (2010). Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: The Hisayama Study. *Neurology* 75, 764–770. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181eee25f.
- Mattace-Raso, F. (2014). Is Memantine + Acetylcholinesterase Inhibitor Treatment Superior to Either Therapy Alone in Alzheimer's Disease? *JAD* 41, 641–642. doi: 10.3233/JAD-140016.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., and Rydel, R. E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243–254. doi: 10.1016/0896-6273(93)90315-I.
- Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet* 349, 1546–1549. doi: 10.1016/S0140-6736(96)10203-8.

- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., et al. (2010). Decreased Clearance of CNS β -Amyloid in Alzheimer's Disease. *Science* 330, 1774–1774. doi: 10.1126/science.1197623.
- McGeer, P. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging* 22, 799–809. doi: 10.1016/S0197-4580(01)00289-5.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Tago, H., and McGeer, E. G. (1987). Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neuroscience Letters* 79, 195–200. doi: 10.1016/0304-3940(87)90696-3.
- McInnes, J., Wierda, K., Snellinx, A., Bounti, L., Wang, Y.-C., Stancu, I.-C., et al. (2018). Synaptogyrin-3 Mediates Presynaptic Dysfunction Induced by Tau. *Neuron* 97, 823-835.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.022.
- Mehla, J., Lacoursiere, S. G., Lapointe, V., McNaughton, B. L., Sutherland, R. J., McDonald, R. J., et al. (2019). Age-dependent behavioral and biochemical characterization of single APP knock-in mouse (APPNL-G-F/NL-G-F) model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 75, 25–37. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.026.
- Melková, K., Zapletal, V., Narasimhan, S., Jansen, S., Hritz, J., Škrabana, R., et al. (2019). Structure and Functions of Microtubule Associated Proteins Tau and MAP2c: Similarities and Differences. *Biomolecules* 9, 105. doi: 10.3390/biom9030105.
- Menkes-Caspi, N., Yamin, H. G., Kellner, V., Spires-Jones, T. L., Cohen, D., and Stern, E. A. (2015). Pathological Tau Disrupts Ongoing Network Activity. *Neuron* 85, 959–966. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.025.
- Merezhko, M., Uronen, R.-L., and Huttunen, H. J. (2020). The Cell Biology of Tau Secretion. *Front Mol. Neurosci.* 13, 569818. doi: 10.3389/fnmol.2020.569818.
- Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., et al. (2006). Exogenous Induction of Cerebral β -Amyloidogenesis Is Governed by Agent and Host. *Science* 313, 1781–1784. doi: 10.1126/science.1131864.
- Meziane, H., Dodart, J.-C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., et al. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the β -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12683–12688. doi: 10.1073/pnas.95.21.12683.
- Miller, C. C., Brion, J. P., Calvert, R., Chin, T. K., Eagles, P. A., Downes, M. J., et al. (1986). Alzheimer's paired helical filaments share epitopes with neurofilament side arms. *The EMBO Journal* 5, 269–276. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04209.x.
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., and Okuno, H. (2016). Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8. doi: 10.3389/fnmol.2015.00078.
- Mitchell, V., Sigala, J., Jumeau, F., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., Ballot, C., et al. (2014). Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J Androl* 16, 927. doi: 10.4103/1008-682X.136446.

- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., et al. (1995). Proline-directed and Non-proline-directed Phosphorylation of PHF-tau. *Journal of Biological Chemistry* 270, 823–829. doi: 10.1074/jbc.270.2.823.
- Morris, M., Hamto, P., Adame, A., Devidze, N., Masliah, E., and Mucke, L. (2013). Age-appropriate cognition and subtle dopamine-independent motor deficits in aged Tau knockout mice. *Neurobiology of Aging* 34, 1523–1529. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.003.
- Mosher, K. I., and Wyss-Coray, T. (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* 88, 594–604. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.008.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Bouras, C., Pradier, L., Gray, F., et al. (2012). Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822, 885–896. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.01.009.
- Moyse, E., Haddad, M., Benlabiod, C., Ramassamy, C., and Krantic, S. (2019). Common Pathological Mechanisms and Risk Factors for Alzheimer's Disease and Type-2 Diabetes: Focus on Inflammation. *CAR* 16, 986–1006. doi: 10.2174/1567205016666191106094356.
- Mufson, E. J., Chen, E.-Y., Cochran, E. J., Beckett, L. A., Bennett, D. A., and Kordower, J. H. (1999). Entorhinal Cortex β -Amyloid Load in Individuals with Mild Cognitive Impairment. *Experimental Neurology* 158, 469–490. doi: 10.1006/exnr.1999.7086.
- Mufson, E. J., Ma, S. Y., Cochran, E. J., Bennett, D. A., Beckett, L. A., Jaffar, S., et al. (2000). Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.* 427, 19–30. doi: 10.1002/1096-9861(20001106)427:1<19::AID-CNE2>3.0.CO;2-A.
- Murray, M. M., Bernstein, S. L., Nyugen, V., Condrón, M. M., Teplow, D. B., and Bowers, M. T. (2009). Amyloid β Protein: A β 40 Inhibits A β 42 Oligomerization. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6316–6317. doi: 10.1021/ja8092604.
- Naj, A. C., Schellenberg, G. D., and for the Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC) (2017). Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview. *Am. J. Med. Genet.* 174, 5–26. doi: 10.1002/ajmg.b.32499.
- Najar, J., Östling, S., Gudmundsson, P., Sundh, V., Johansson, L., Kern, S., et al. (2019). Cognitive and physical activity and dementia: A 44-year longitudinal population study of women. *Neurology* 92, e1322–e1330. doi: 10.1212/WNL.0000000000007021.
- Nakayama, K., Ohkawara, T., Hiratochi, M., Koh, C.-S., and Nagase, H. (2008). The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis. *Neuroscience Letters* 444, 127–131. doi: 10.1016/j.neulet.2008.08.034.
- Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., et al. (2017). Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *J. Neurosci.* 37, 11406–11423. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1230-17.2017.
- Nasreddine, Z. S., Phillips, N. A., Bäcklund, V., Charbonneau, S., Whitehead, V., Collin, I., et al. (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild

- Cognitive Impairment: MOCA: A BRIEF SCREENING TOOL FOR MCI. *Journal of the American Geriatrics Society* 53, 695–699. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O’Leary, D. D. M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989. doi: 10.1038/nature07767.
- Nithianantharajah, J., and Grant, S. G. N. (2013). Cognitive components in mice and humans: Combining genetics and touchscreens for medical translation. *Neurobiology of Learning and Memory* 105, 13–19. doi: 10.1016/j.nlm.2013.06.006.
- Nixon, R. A., and Cataldo, A. M. (2006). Lysosomal system pathways: Genes to neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *JAD* 9, 277–289. doi: 10.3233/JAD-2006-9S331.
- Nixon, R. A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer’s disease—locating the primary defect. *Neurobiology of Disease* 43, 38–45. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.021.
- Nygaard, H. B. (2018). Targeting Fyn Kinase in Alzheimer’s Disease. *Biological Psychiatry* 83, 369–376. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.06.004.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer’s disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129–10140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.
- Oblak, A. L., Forner, S., Territo, P. R., Sasner, M., Carter, G. W., Howell, G. R., et al. (2020). Model organism development and evaluation for late-onset Alzheimer’s disease: MODEL-AD. *A&D Transl Res & Clin Interv* 6. doi: 10.1002/trc2.12110.
- O’Brien, J. T., Erkinjuntti, T., Reisberg, B., Roman, G., Sawada, T., Pantoni, L., et al. (2003). Vascular cognitive impairment. *The Lancet Neurology* 2, 89–98. doi: 10.1016/S1474-4422(03)00305-3.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer’s disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00434-3.
- Ogomori, K., Kitamoto, T., Tateishi, J., Sato, Y., Suetsugu, M., and Abe, M. (1989). Beta-protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer’s disease. *Am. J. Pathol.* 134, 243–251.
- Oh, E. S., Savonenko, A. V., King, J. F., Fangmark Tucker, S. M., Rudow, G. L., Xu, G., et al. (2009). Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 30, 1238–1244. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.024.
- Okamura, N., Harada, R., Furumoto, S., Arai, H., Yanai, K., and Kudo, Y. (2014). Tau PET Imaging in Alzheimer’s Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 500. doi: 10.1007/s11910-014-0500-6.
- Okano, H., Sasaki, E., Yamamori, T., Iriki, A., Shimogori, T., Yamaguchi, Y., et al. (2016). Brain/MINDS: A Japanese National Brain Project for Marmoset Neuroscience. *Neuron* 92, 582–590. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.018.
- Oksanen, M., Lehtonen, S., Jaronen, M., Goldsteins, G., Hämäläinen, R. H., and Koistinaho, J. (2019). Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human

- induced pluripotent stem cell platforms. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2739–2760. doi: 10.1007/s00018-019-03111-7.
- Okuno, H., Akashi, K., Ishii, Y., Yagishita-Kyo, N., Suzuki, K., Nonaka, M., et al. (2012). Inverse Synaptic Tagging of Inactive Synapses via Dynamic Interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* 149, 886–898. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.062.
- Oliveira, R. B., Maschio, D. A., Carvalho, C. P. F., and Collares-Buzato, C. B. (2015). Influence of gender and time diet exposure on endocrine pancreas remodeling in response to high fat diet-induced metabolic disturbances in mice. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 200, 88–97. doi: 10.1016/j.aanat.2015.01.007.
- Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A. P., Hofman, A., and Breteler, M. M. B. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53, 1937–1937. doi: 10.1212/WNL.53.9.1937.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 118, 3030–3044. doi: 10.1002/ijc.21731.
- Pavliukeviciene, B., Zentelyte, A., Jankunec, M., Valiuliene, G., Talaikis, M., Navakauskiene, R., et al. (2019). Amyloid β oligomers inhibit growth of human cancer cells. *PLoS ONE* 14, e0221563. doi: 10.1371/journal.pone.0221563.
- Perea, J. R., Llorens-Martín, M., Ávila, J., and Bolós, M. (2018). The Role of Microglia in the Spread of Tau: Relevance for Tauopathies. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 172. doi: 10.3389/fncel.2018.00172.
- 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. doi: 10.3389/fnins.2019.00442.
- Perez-Nievas, B. G., Stein, T. D., Tai, H.-C., Dols-Icardo, O., Scotton, T. C., Barroeta-Espar, I., et al. (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* 136, 2510–2526. doi: 10.1093/brain/awt171.
- Picken, M. M. (2020). The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol* 143, 322–334. doi: 10.1159/000506696.
- Pickett, E. K., Herrmann, A. G., McQueen, J., Abt, K., Dando, O., Tulloch, J., et al. (2019). Amyloid Beta and Tau Cooperate to Cause Reversible Behavioral and Transcriptional Deficits in a Model of Alzheimer's Disease. *Cell Reports* 29, 3592–3604.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.044.
- Pirttimaki, T. M., Codadu, N. K., Awni, A., Pratik, P., Nagel, D. A., Hill, E. J., et al. (2013). α 7 Nicotinic Receptor-Mediated Astrocytic Gliotransmitter Release: A β Effects in a Preclinical Alzheimer's Mouse Model. *PLoS ONE* 8, e81828. doi: 10.1371/journal.pone.0081828.
- Polydoro, M., Acker, C. M., Duff, K., Castillo, P. E., and Davies, P. (2009). Age-Dependent Impairment of Cognitive and Synaptic Function in the htau Mouse Model of Tau Pathology. *Journal of Neuroscience* 29, 10741–10749. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1065-09.2009.
- 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 Rep* 14, 389–394. doi: 10.1038/embor.2013.15.

- Pooler, A. M., Polydoro, M., Maury, E. A., Nicholls, S. B., Reddy, S. M., Wegmann, S., et al. (2015). Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *acta neuropathol commun* 3, 14. doi: 10.1186/s40478-015-0199-x.
- Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., et al. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of Neurology* 43, 815–825. doi: 10.1002/ana.410430617.
- Postina, R. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation* 114, 598–598. doi: 10.1172/JCI200420864E1.
- Price, D. L., Martin, L. J., Sisodia, S. S., Wagster, M. V., Koo, E. H., Walker, L. C., et al. (1991). Aged Non-Human Primates: An Animal Model of Age-Associated Neurodegenerative Disease. *Brain Pathology* 1, 287–296. doi: 10.1111/j.1750-3639.1991.tb00672.x.
- Prinz, M., Jung, S., and Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179, 292–311. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.053.
- Prusiner, S. B. (2012). A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases. *Science* 336, 1511–1513. doi: 10.1126/science.1222951.
- Przybyla, M., van Eersel, J., van Hummel, A., van der Hoven, J., Sabale, M., Harasta, A., et al. (2020). Onset of hippocampal network aberration and memory deficits in P301S tau mice are associated with an early gene signature. *Brain* 143, 1889–1904. doi: 10.1093/brain/awaa133.
- Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., and Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 10, 703–711. doi: 10.1517/17460441.2015.1041913.
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., and Arancio, O. (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol* 88, 450–467. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.011.
- Puzzo, D., Piacentini, R., Fá, M., Gulisano, W., Li Puma, D. D., Staniszewski, A., et al. (2017). LTP and memory impairment caused by extracellular A β and Tau oligomers is APP-dependent. *eLife* 6, e26991. doi: 10.7554/eLife.26991.
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., et al. (2011). Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69, 819–830. doi: 10.1002/ana.22313.
- Qiu, W. Q., and Folstein, M. F. (2006). Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27, 190–198. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.004.
- Qu, Z., Jiao, Z., Sun, X., Zhao, Y., Ren, J., and Xu, G. (2011). Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Research* 1383, 300–306. doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.084.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., et al. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7, 940–946. doi: 10.1038/sj.embor.7400784.

- Rajmohan, R., and Reddy, P. H. (2017). Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. *JAD* 57, 975–999. doi: 10.3233/JAD-160612.
- Ramirez-Amaya, V. (2005). Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation. *Journal of Neuroscience* 25, 1761–1768. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005.
- Ramos-Rodriguez, J. J., Jimenez-Palomares, M., Murillo-Carretero, M. I., Infante-Garcia, C., Berrocoso, E., Hernandez-Pacho, F., et al. (2015). Central vascular disease and exacerbated pathology in a mixed model of type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 62, 69–79. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.07.606.
- Rao, S. S., and Adlard, P. A. (2018). Untangling Tau and Iron: Exploring the Interaction Between Iron and Tau in Neurodegeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 276. doi: 10.3389/fnmol.2018.00276.
- Rasmussen, J., Jucker, M., and Walker, L. C. (2017). A β seeds and prions: How close the fit? *Prion* 11, 215–225. doi: 10.1080/19336896.2017.1334029.
- Rauch, J. N., Luna, G., Guzman, E., Audouard, M., Challis, C., Sibih, Y. E., et al. (2020). LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature* 580, 381–385. doi: 10.1038/s41586-020-2156-5.
- Redondo, R. L., and Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 12, 17–30. doi: 10.1038/nrn2963.
- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., and Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences* 29, 613–627. doi: 10.1515/revneuro-2017-0063.
- Reitz, C. (2015). Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: challenges and opportunities. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 15, 339–348. doi: 10.1586/14737159.2015.1002469.
- Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology* 88, 640–651. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.024.
- Ribé, E. M., Pérez, M., Puig, B., Gich, I., Lim, F., Cuadrado, M., et al. (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiology of Disease* 20, 814–822. doi: 10.1016/j.nbd.2005.05.027.
- Rice, H. C., de Malmazet, D., Schreurs, A., Frere, S., Van Molle, I., Volkov, A. N., et al. (2019). Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA_B R1a ligand to modulate synaptic transmission. *Science* 363, eaao4827. doi: 10.1126/science.aao4827.
- Ristow, M. (2004). Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med (Berl)* 82, 510–529. doi: 10.1007/s00109-004-0552-1.
- Ritchie, K. (2004). Mild cognitive impairment: an epidemiological perspective. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 6, 401–408. doi: 10.31887/DCNS.2004.6.4/kritchie.
- Roberson, E. D., Halabisky, B., Yoo, J. W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., et al. (2011). Amyloid- /Fyn-Induced Synaptic, Network, and Cognitive Impairments Depend on Tau Levels in Multiple Mouse

- Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* 31, 700–711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., et al. (2007). Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science* 316, 750–754. doi: 10.1126/science.1141736.
- Rocca, W. A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M. M. B., Clarke, M., Copeland, J. R. M., et al. (1991). Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: A collaborative study of 1980-1990 prevalence findings: Prevalence of Alzheimer's Disease in Europe. *Ann Neurol* 30, 381–390. doi: 10.1002/ana.410300310.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Miralpeix, C., Fosch, A., Pozo, M., Calderón-Domínguez, M., Perpinyà, X., et al. (2019). CPT1C in the ventromedial nucleus of the hypothalamus is necessary for brown fat thermogenesis activation in obesity. *Molecular Metabolism* 19, 75–85. doi: 10.1016/j.molmet.2018.10.010.
- Roher, A. E., Esh, C. L., Kokjohn, T. A., Castaño, E. M., Van Vickle, G. D., Kalback, W. M., et al. (2009). Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 5, 18–29. doi: 10.1016/j.jalz.2008.10.004.
- Rojas, I. (2021). Common variants in Alzheimer's disease and risk stratification by polygenic risk scores.
- Rosenmann, H., Grigoriadis, N., Eldar-Levy, H., Avital, A., Rozenstein, L., Touloumi, O., et al. (2008). A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Experimental Neurology* 212, 71–84. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.03.007.
- Rossi, G., Bastone, A., Piccoli, E., Mazzoleni, G., Morbin, M., Uggetti, A., et al. (2012). New mutations in MAPT gene causing frontotemporal lobar degeneration: biochemical and structural characterization. *Neurobiology of Aging* 33, 834.e1-834.e6. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.008.
- Rossini, P. M., Di Iorio, R., Vecchio, F., Anfossi, M., Babiloni, C., Bozzali, M., et al. (2020). Early diagnosis of Alzheimer's disease: the role of biomarkers including advanced EEG signal analysis. Report from the IFCN-sponsored panel of experts. *Clinical Neurophysiology* 131, 1287–1310. doi: 10.1016/j.clinph.2020.03.003.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M.-Y., and Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 109, 5–13. doi: 10.1007/s00401-004-0952-x.
- Rudy, C. C., Hunsberger, H. C., Weitzner, D. S., and Reed, M. N. (2015). The Role of the Tripartite Glutamatergic Synapse in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Aging and disease* 6, 131. doi: 10.14336/AD.2014.0423.
- Ruiz-Riquelme, A., Lau, H. H. C., Stuart, E., Goczi, A. N., Wang, Z., Schmitt-Ulms, G., et al. (2018). Prion-like propagation of β -amyloid aggregates in the absence of APP overexpression. *acta neuropathol commun* 6, 26. doi: 10.1186/s40478-018-0529-x.

- Sadick, J. S., O’Dea, M. R., Hasel, P., Dykstra, T., Faustin, A., and Liddelow, S. A. (2022). Astrocytes and oligodendrocytes undergo subtype-specific transcriptional changes in Alzheimer’s disease. *Neuron* 110, 1788-1805.e10. doi: 10.1016/j.neuron.2022.03.008.
- Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., et al. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer’s disease. *Nature Neuroscience* 17, 661–663. doi: 10.1038/nn.3697.
- Saito, T., Matsuba, Y., Yamazaki, N., Hashimoto, S., and Saido, T. C. (2016). Calpain Activation in Alzheimer’s Model Mice Is an Artifact of APP and Presenilin Overexpression. *Journal of Neuroscience* 36, 9933–9936. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1907-16.2016.
- Saito, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Narasimhan, S., et al. (2019). Humanization of the entire murine *Mapt* gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *J. Biol. Chem.* 294, 12754–12765. doi: 10.1074/jbc.RA119.009487.
- Sajja, V. S. S. S., Hlavac, N., and VandeVord, P. J. (2016). Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury: Biomarkers of Glia Dysfunction. *Front Integr Neurosci* 10, 7. doi: 10.3389/fnint.2016.00007.
- Sanders, D. W., Kaufman, S. K., DeVos, S. L., Sharma, A. M., Mirbaha, H., Li, A., et al. (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82, 1271–1288. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.047.
- SantaCruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., et al. (2005a). Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science* 309, 476–481. doi: 10.1126/science.1113694.
- SantaCruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., et al. (2005b). Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science* 309, 476–481. doi: 10.1126/science.1113694.
- Santello, M., Toni, N., and Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci* 22, 154–166. doi: 10.1038/s41593-018-0325-8.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., et al. (1999). Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177. doi: 10.1038/22124.
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., et al. (2006). Alzheimer’s disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 169, 599–616. doi: 10.2353/ajpath.2006.060002.
- Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer’s disease. *Nature* 399, A23–A31. doi: 10.1038/399a023.
- Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* 8, 595–608. doi: 10.15252/emmm.201606210.
- Selkoe, D., Mandelkow, E., and Holtzman, D. (2012). Deciphering Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a011460–a011460. doi: 10.1101/cshperspect.a011460.

- Sepulcre, J., Schultz, A. P., Sabuncu, M., Gomez-Isla, T., Chhatwal, J., Becker, A., et al. (2016). In Vivo Tau, Amyloid, and Gray Matter Profiles in the Aging Brain. *Journal of Neuroscience* 36, 7364–7374. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0639-16.2016.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Review of Proteomics* 5, 207–224. doi: 10.1586/14789450.5.2.207.
- Serrano-Pozo, A., Das, S., and Hyman, B. T. (2021). APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology* 20, 68–80. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G. V. W., et al. (1995). Detection of Phosphorylated Ser262 in Fetal Tau, Adult Tau, and Paired Helical Filament Tau. *Journal of Biological Chemistry* 270, 18917–18922. doi: 10.1074/jbc.270.32.18917.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837–842. doi: 10.1038/nm1782.
- Shaw, L. M., Vanderstichele, H., Knapik-Czajka, M., Clark, C. M., Aisen, P. S., Petersen, R. C., et al. (2009). Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 65, 403–413. doi: 10.1002/ana.21610.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760. doi: 10.1038/375754a0.
- Shin, R.-W., Ogino, K., Shimabuku, A., Taki, T., Nakashima, H., Ishihara, T., et al. (2007). Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of A β and tau. *Acta Neuropathol* 113, 627–636. doi: 10.1007/s00401-007-0211-z.
- Shipton, O. A., Leitz, J. R., Dworzak, J., Acton, C. E. J., Tunbridge, E. M., Denk, F., et al. (2011). Tau Protein Is Required for Amyloid -Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience* 31, 1688–1692. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011.
- Shirazi, S. K., and Wood, J. G. (1993). The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology: *NeuroReport* 4, 435–437. doi: 10.1097/00001756-199304000-00024.
- Sibille, N., Huvent, I., Fauquant, C., Verdegem, D., Amniai, L., Leroy, A., et al. (2012). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein: Phospho-Tau Structure. *Proteins* 80, 454–462. doi: 10.1002/prot.23210.
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., et al. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 6, 6. doi: 10.3390/biom6010006.
- Simons, M., and Nave, K.-A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a020479. doi: 10.1101/cshperspect.a020479.

- Simpson, J. E., Ince, P. G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P. J., Matthews, F., et al. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging* 31, 578–590. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.015.
- Sloane, P. D., Zimmerman, S., Suchindran, C., Reed, P., Wang, L., Boustani, M., et al. (2002). The Public Health Impact of Alzheimer's Disease, 2000–2050: Potential Implication of Treatment Advances. *Annu. Rev. Public Health* 23, 213–231. doi: 10.1146/annurev.publhealth.23.100901.140525.
- Smith, T., Gildeh, N., and Holmes, C. (2007). The Montreal Cognitive Assessment: Validity and Utility in a Memory Clinic Setting. *Can J Psychiatry* 52, 329–332. doi: 10.1177/070674370705200508.
- Snow, A. D., and Wight, T. N. (1989). Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiology of Aging* 10, 481–497. doi: 10.1016/0197-4580(89)90108-5.
- Sokolow, S., Henkins, K. M., Bilousova, T., Gonzalez, B., Vinters, H. V., Miller, C. A., et al. (2015). Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 133, 368–379. doi: 10.1111/jnc.12991.
- Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7737–7741. doi: 10.1073/pnas.95.13.7737.
- Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., et al. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25, 7278–7287. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1879-05.2005.
- Spires-Jones, T. L., and Hyman, B. T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82, 756–771. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.
- St George-Hyslop, P. H. (2000). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 47, 183–199. doi: 10.1016/S0006-3223(99)00301-7.
- Steinerman, J. R., Irizarry, M., Scarneas, N., Raju, S., Brandt, J., Albert, M., et al. (2008). Distinct Pools of β -Amyloid in Alzheimer Disease-Affected Brain: A Clinicopathologic Study. *Arch Neurol* 65. doi: 10.1001/archneur.65.7.906.
- Stevens, L. M., and Brown, R. E. (2015). Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: a cross-sectional study. *Behav Brain Res* 278, 496–505. doi: 10.1016/j.bbr.2014.10.033.
- Stöhr, J., Watts, J. C., Mensinger, Z. L., Oehler, A., Grillo, S. K., DeArmond, S. J., et al. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta ($A\beta$) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11025–11030. doi: 10.1073/pnas.1206555109.
- Stoltenberg, M., Bruhn, M., Søndergaard, C., Doering, P., West, M. J., Larsen, A., et al. (2005). Immersion autometallographic tracing of zinc ions in Alzheimer beta-amyloid plaques. *Histochem Cell Biol* 123, 605–611. doi: 10.1007/s00418-005-0787-0.

- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13287–13292. doi: 10.1073/pnas.94.24.13287.
- Sue Kirkman, M., Briscoe, V. J., Clark, N., Florez, H., Haas, L. B., Halter, J. B., et al. (2012). Diabetes in Older Adults: A Consensus Report. *J Am Geriatr Soc* 60, 2342–2356. doi: 10.1111/jgs.12035.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal of Biological Chemistry* 286, 4566–4575. doi: 10.1074/jbc.M110.199976.
- Supnet, C., and Bezprozvanny, I. (2010). The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium* 47, 183–189. doi: 10.1016/j.ceca.2009.12.014.
- 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. doi: 10.1016/j.neulet.2017.05.056.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X.-D., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., et al. (1994). An Increased Percentage of Long Amyloid β Protein Secreted by Familial Amyloid β Protein Precursor (β App₇₁₇) Mutants. *Science* 264, 1336–1340. doi: 10.1126/science.8191290.
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., and Khan, S. M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842, 1219–1231. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.09.010.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., et al. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45, D362–D368. doi: 10.1093/nar/gkw937.
- Szydłowska, K., and Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47, 122–129. doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.
- Tackenberg, C., and Nitsch, R. M. (2019). The secreted APP ectodomain sAPP α , but not sAPP β , protects neurons against A β oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. *Mol Brain* 12, 27. doi: 10.1186/s13041-019-0447-2.
- Tai, C., Chang, C.-W., Yu, G.-Q., Lopez, I., Yu, X., Wang, X., et al. (2020). Tau Reduction Prevents Key Features of Autism in Mouse Models. *Neuron* 106, 421–437.e11. doi: 10.1016/j.neuron.2020.01.038.
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., et al. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A β deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7036–7041. doi: 10.1073/pnas.1000645107.
- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., et al. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338. doi: 10.1172/JCI59903.

- Tamaye, R., Matsuda, S., Arancio, O., and D'Adamio, L. (2012). β - but not γ -secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia. *EMBO Mol Med* 4, 171–179. doi: 10.1002/emmm.201100195.
- Tanzi, R. E. (2012). The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006296–a006296. doi: 10.1101/cshperspect.a006296.
- Tardivel, M., Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., et al. (2016). Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *acta neuropathol commun* 4, 117. doi: 10.1186/s40478-016-0386-4.
- Targa Dias Anastacio, H., Matosin, N., and Ooi, L. (2022). Neuronal hyperexcitability in Alzheimer's disease: what are the drivers behind this aberrant phenotype? *Transl Psychiatry* 12, 257. doi: 10.1038/s41398-022-02024-7.
- Tarkowski, E. (2003). Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74, 1200–1205. doi: 10.1136/jnnp.74.9.1200.
- 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. doi: 10.1097/00001756-199708180-00029.
- Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R., et al. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiology of Disease* 31, 250–260. doi: 10.1016/j.nbd.2008.04.011.
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800. doi: 10.1212/WNL.58.12.1791.
- the Dominantly Inherited Alzheimer Network, Barthélemy, N. R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B. A., Hassenstab, J., et al. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat Med* 26, 398–407. doi: 10.1038/s41591-020-0781-z.
- Tortelli, R., Lozupone, M., Guerra, V., Barulli, M. R., Imbimbo, B. P., Capozzo, R., et al. (2017). Midlife Metabolic Profile and the Risk of Late-Life Cognitive Decline. *JAD* 59, 121–130. doi: 10.3233/JAD-170153.
- Tracy, T. E., Sohn, P. D., Minami, S. S., Wang, C., Min, S.-W., Li, Y., et al. (2016). Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss. *Neuron* 90, 245–260. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.005.
- Trinchese, F., Liu, S., Battaglia, F., Walter, S., Mathews, P. M., and Arancio, O. (2004). Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Annals of Neurology* 55, 801–814. doi: 10.1002/ana.20101.
- Tse, D., Takeuchi, T., Kakeyama, M., Kajii, Y., Okuno, H., Tohyama, C., et al. (2011). Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science* 333, 891–895. doi: 10.1126/science.1205274.

- Tsoi, K. K. F., Chan, J. Y. C., Hirai, H. W., Wong, S. Y. S., and Kwok, T. C. Y. (2015). Cognitive Tests to Detect Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 175, 1450. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.2152.
- Tsvetkov, P. O., La Rocca, R., Malesinski, S., and Devred, F. (2019). "Characterization of Microtubule-Associated Proteins (MAPs) and Tubulin Interactions by Isothermal Titration Calorimetry (ITC)," in *Microcalorimetry of Biological Molecules Methods in Molecular Biology*, ed. E. Ennifar (New York, NY: Springer New York), 151–165. doi: 10.1007/978-1-4939-9179-2_12.
- Tucker, K. L., Meyer, M., and Barde, Y.-A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4, 29–37. doi: 10.1038/82868.
- Uchihara, T., Duyckaerts, C., Lazarini, F., Mokhtari, K., Seilhean, D., Amouyel, P., et al. (1996). Inconstant apolipoprotein E (ApoE)-like immunoreactivity in amyloid β protein deposits: relationship with APOE genotype in aging brain and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 92, 180–185. doi: 10.1007/s004010050506.
- Uddin, Md. S., Kabir, Md. T., Tewari, D., Mamun, A. A., Mathew, B., Aleya, L., et al. (2020). Revisiting the role of brain and peripheral A β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 416, 116974. doi: 10.1016/j.jns.2020.116974.
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., et al. (2014). Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589–6631. doi: 10.1021/cr400525m.
- Vandal, M., White, P. J., Chevrier, G., Tremblay, C., St-Amour, I., Planel, E., et al. (2015). Age-dependent impairment of glucose tolerance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *FASEBj* 29, 4273–4284. doi: 10.1096/fj.14-268482.
- Vasconcelos, B., Stancu, I.-C., Buist, A., Bird, M., Wang, P., Vanoosthuyse, A., et al. (2016). Heterotypic seeding of Tau fibrillization by pre-aggregated Abeta provides potent seeds for prion-like seeding and propagation of Tau-pathology in vivo. *Acta Neuropathol* 131, 549–569. doi: 10.1007/s00401-015-1525-x.
- Veerhuis, R., Van Breemen, M. J., Hoozemans, J. J., Morbin, M., Ouladhadj, J., Tagliavini, F., et al. (2003). Amyloid β plaque-associated proteins C1q and SAP enhance the A β 1–42 peptide-induced cytokine secretion by adult human microglia in vitro. *Acta Neuropathol* 105, 135–144. doi: 10.1007/s00401-002-0624-7.
- Velazquez, R., Ferreira, E., Tran, A., Turner, E. C., Belfiore, R., Branca, C., et al. (2018). Acute tau knockdown in the hippocampus of adult mice causes learning and memory deficits. *Aging Cell* 17, e12775. doi: 10.1111/acel.12775.
- Verbeek, M. M., Otte-Höller, I., Westphal, J. R., Wesseling, P., Ruiter, D. J., and de Waal, R. M. (1994). Accumulation of intercellular adhesion molecule-1 in senile plaques in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 144, 104–116.
- Vergara, C., Houben, S., Suain, V., Yilmaz, Z., De Decker, R., Vanden Dries, V., et al. (2019). Amyloid- β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta Neuropathol* 137, 397–412. doi: 10.1007/s00401-018-1953-5.

- Villemagne, V. L., Pike, K. E., Chételat, G., Ellis, K. A., Mulligan, R. S., Bourgeat, P., et al. (2011). Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol* 69, 181–192. doi: 10.1002/ana.22248.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi: 10.3389/fncel.2014.00084.
- Vogels, T., Murgoci, A.-N., and Hromádka, T. (2019). Intersection of pathological tau and microglia at the synapse. *acta neuropathol commun* 7, 109. doi: 10.1186/s40478-019-0754-y.
- von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., et al. (2001). Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local β -Structure. *Journal of Biological Chemistry* 276, 48165–48174. doi: 10.1074/jbc.M105196200.
- von Bernhardi, R., Cornejo, F., Parada, G. E., and Eugenin, J. (2015). Role of TGF β signaling in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00426.
- Vonsattel, J. P. G., Myers, R. H., Tessa Hedley-Whyte, E., Ropper, A. H., Bird, E. D., and Richardson, E. P. (1991). Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: A comparative histological study. *Ann Neurol*. 30, 637–649. doi: 10.1002/ana.410300503.
- Vossel, K. A., Tartaglia, M. C., Nygaard, H. B., Zeman, A. Z., and Miller, B. L. (2017). Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance. *The Lancet Neurology* 16, 311–322. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30044-3.
- Walker, L. C., Schelle, J., and Jucker, M. (2016). The Prion-Like Properties of Amyloid- β Assemblies: Implications for Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a024398. doi: 10.1101/cshperspect.a024398.
- Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience* 17, 22–35. doi: 10.1038/nrn.2015.1.
- Warmus, B. A., Sekar, D. R., McCutchen, E., Schellenberg, G. D., Roberts, R. C., McMahon, L. L., et al. (2014). Tau-Mediated NMDA Receptor Impairment Underlies Dysfunction of a Selectively Vulnerable Network in a Mouse Model of Frontotemporal Dementia. *J. Neurosci.* 34, 16482–16495. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3418-14.2014.
- Watts, J. C., Condello, C., Stohr, J., Oehler, A., Lee, J., DeArmond, S. J., et al. (2014). Serial propagation of distinct strains of A prions from Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 10323–10328. doi: 10.1073/pnas.1408900111.
- Wegmann, S., Biernat, J., and Mandelkow, E. (2021). A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* 69, 131–138. doi: 10.1016/j.conb.2021.03.003.
- Wei, W. (2002). Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain* 125, 2036–2043. doi: 10.1093/brain/awf205.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1858–1862. doi: 10.1073/pnas.72.5.1858.

- Wesseling, H., Mair, W., Kumar, M., Schaffner, C. N., Tang, S., Beerepoot, P., et al. (2020). Tau PTM Profiles Identify Patient Heterogeneity and Stages of Alzheimer's Disease. *Cell* 183, 1699-1713.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.029.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., and Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet* 344, 769-772. doi: 10.1016/S0140-6736(94)92338-8.
- Westermarck, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S.-I., et al. (2007). A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid* 14, 179-183. doi: 10.1080/13506120701460923.
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., Ahrens, R., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2018a). Tau ablation in mice leads to pancreatic β cell dysfunction and glucose intolerance. *FASEBj*. 32, 3166-3173. doi: 10.1096/fj.201701352.
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2018b). Impaired peripheral glucose homeostasis and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 136, 172-181. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.027.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., et al. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 17513-17518. doi: 10.1073/pnas.0602841103.
- Wirhiths, O., and Bayer, T. A. (2012). Intraneuronal A β accumulation and neurodegeneration: Lessons from transgenic models. *Life Sciences* 91, 1148-1152. doi: 10.1016/j.lfs.2012.02.001.
- Woerman, A. L., Aoyagi, A., Patel, S., Kazmi, S. A., Lobach, I., Grinberg, L. T., et al. (2016). Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E8187-E8196. doi: 10.1073/pnas.1616344113.
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., et al. (2001). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2B ϵ at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochemical Journal* 355, 609-615. doi: 10.1042/bj3550609.
- Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 18-29. doi: 10.1038/nrm3920.
- Wyss-Coray, T., and Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006346. doi: 10.1101/cshperspect.a006346.
- Xu, L., He, D., and Bai, Y. (2016). Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease. *Mol Neurobiol* 53, 6709-6715. doi: 10.1007/s12035-015-9593-4.
- Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C.-C., and Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15, 501-518. doi: 10.1038/s41582-019-0228-7.

- Yan, H., Yang, W., Zhou, F., Li, X., Pan, Q., Shen, Z., et al. (2019). Estrogen Improves Insulin Sensitivity and Suppresses Gluconeogenesis via the Transcription Factor Foxo1. *Diabetes* 68, 291–304. doi: 10.2337/db18-0638.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K., and Kirschner, D. A. (1990). Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid β Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides. *Science* 250, 279–282. doi: 10.1126/science.2218531.
- Yoshikawa, M., Soeda, Y., Michikawa, M., Almeida, O. F. X., and Takashima, A. (2018). Tau Depletion in APP Transgenic Mice Attenuates Task-Related Hyperactivation of the Hippocampus and Differentially Influences Locomotor Activity and Spatial Memory. *Front. Neurosci.* 12, 124. doi: 10.3389/fnins.2018.00124.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., et al. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53, 337–351. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010.
- Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., and Selkoe, D. J. (2007). A Critical Function for β -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference. *Journal of Neuroscience* 27, 14459–14469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., et al. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *Journal of Neuroscience* 32, 6391–6410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2010). A Oligomers Cause Localized Ca^{2+} Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *Journal of Neuroscience* 30, 11938–11950. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010.
- Zhang, B. (2004). Retarded Axonal Transport of R406W Mutant Tau in Transgenic Mice with a Neurodegenerative Tauopathy. *Journal of Neuroscience* 24, 4657–4667. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0797-04.2004.
- Zhang, J., Chen, C., Hua, S., Liao, H., Wang, M., Xiong, Y., et al. (2017). An updated meta-analysis of cohort studies: Diabetes and risk of Alzheimer's disease. *Diabetes Research and Clinical Practice* 124, 41–47. doi: 10.1016/j.diabres.2016.10.024.
- Zhao, W., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., et al. (2008). Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB j.* 22, 246–260. doi: 10.1096/fj.06-7703com.
- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., et al. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023-1031.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.031.
- Zott, B., Simon, M. M., Hong, W., Unger, F., Chen-Engerer, H.-J., Frosch, M. P., et al. (2019). A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science* 365, 559–565. doi: 10.1126/science.aay0198.

ANNEXES



Impaired Glucose Homeostasis in a Tau Knock-In Mouse Model

Hamza Benderradji^{1,2†}, Sarra Kraiem^{1,2†}, Emilie Courty³, Sabiha Eddarkaoui^{1,2}, Cyril Bourouh³, Emilie Faivre^{1,2}, Laure Rolland³, Emilie Caron^{1,4}, Mélanie Besegher⁵, Frederik Oger³, Theo Boschetti^{1,2}, Kévin Carvalho^{1,2}, Bryan Thiroux^{1,2}, Thibaut Gauvrit^{1,2}, Emilie Nicolas⁶, Victoria Gomez-Murcia^{1,2}, Anna Bogdanova^{1,2}, Antonino Bongiovanni⁷, Anne Muhr-Tailleux⁶, Steve Lancel⁸, Kadiombo Bantubungi⁶, Nicolas Sergeant^{1,2}, Jean-Sebastien Annicotte³, Luc Buée^{1,2}, Didier Vieau^{1,2}, David Blum^{1,2*†} and Valérie Buée-Scherrer^{1,2†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Tiago F. Outeiro,
University Medical Center
Goettingen, Germany

Reviewed by:

Emmanuel Planel,
Laval University, Canada
Monica Garcia-Alloza,
University of Cádiz, Spain

*Correspondence:

David Blum
david.blum@inserm.fr

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Brain Disease Mechanisms,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Neuroscience

Received: 22 December 2021

Accepted: 21 January 2022

Published: 16 February 2022

Citation:

Benderradji H, Kraiem S, Courty E, Eddarkaoui S, Bourouh C, Faivre E, Rolland L, Caron E, Besegher M, Oger F, Boschetti T, Carvalho K, Thiroux B, Gauvrit T, Nicolas E, Gomez-Murcia V, Bogdanova A, Bongiovanni A, Muhr-Tailleux A, Lancel S, Bantubungi K, Sergeant N, Annicotte J-S, Buée L, Vieau D, Blum D and Buée-Scherrer V (2022) Impaired Glucose Homeostasis in a Tau Knock-In Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.* 15:841892. doi: 10.3389/fnmol.2022.841892

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1172 LiNCog—Lille Neuroscience & Cognition, Lille, France, ²Alzheimer & Tauopathies, LabEx DISTALZ, Lille, France, ³Univ. Lille, INSERM, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Inserm U1283-UMR8199—EGID, Lille, France, ⁴Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille, France, ⁵Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41—UMS 2014—PLBS, Animal Facility, Lille, France, ⁶Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, Lille, France, ⁷Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41—UMS 2014—PLBS, Biomedicine Center Lille, Lille, France, ⁸Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167—RID-AGE—Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, Lille, France

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia. While impaired glucose homeostasis has been shown to increase AD risk and pathological loss of tau function, the latter has been suggested to contribute to the emergence of the glucose homeostasis alterations observed in AD patients. However, the links between tau impairments and glucose homeostasis, remain unclear. In this context, the present study aimed at investigating the metabolic phenotype of a new tau knock-in (KI) mouse model, expressing, at a physiological level, a human tau protein bearing the P301L mutation under the control of the endogenous mouse *Mapt* promoter. Metabolic investigations revealed that, while under chow diet tau KI mice do not exhibit significant metabolic impairments, male but not female tau KI animals under High-Fat Diet (HFD) exhibited higher insulinemia as well as glucose intolerance as compared to control littermates. Using immunofluorescence, tau protein was found colocalized with insulin in the β cells of pancreatic islets in both mouse (WT, KI) and human pancreas. Isolated islets from tau KI and tau knock-out mice exhibited impaired glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), an effect recapitulated in the mouse pancreatic β -cell line (MIN6) following tau knock-down. Altogether, our data indicate that loss of tau function in tau KI mice and, particularly, dysfunction of pancreatic β cells might promote glucose homeostasis impairments and contribute to metabolic changes observed in AD.

Keywords: tau, glucose homeostasis, energy metabolism, mouse model, high-fat

INTRODUCTION

Neurofibrillary degeneration, made of aggregates of hyper- and abnormally phosphorylated tau proteins (tau pathology) is a neuropathological hallmark of tauopathies including Alzheimer's disease (AD; Sergeant et al., 2008; Colin et al., 2020). In the latter, the spatio-temporal progression of tau pathology has been tightly correlated to cognitive deficits,

supporting an instrumental role (Colin et al., 2020). Whether this relates to a toxic gain or a pathological loss of tau function remains debated (Maeda and Mucke, 2016). Indeed, on the one hand, transgenic models developing tau pathology exhibit synaptic impairments and cognitive deficits (i.e., Van der Jeugd et al., 2013). On the other hand, tau knock-out or knock-down models display similar alterations (Ahmed et al., 2015; Biundo et al., 2018; Velazquez et al., 2018). These latter observations particularly support that tau, essentially expressed by neurons in the nervous system, exerts physiological functions whose loss promotes neuron-autonomous dysfunctions. This might relate to the ability of tau to control microtubule dynamics but possibly to other mechanisms, providing that tau is now acknowledged to be more than a microtubule-associated protein (Sotiropoulos et al., 2017). From a general perspective, the physiological functions of tau remain ill-defined.

Diabetes and impaired glucose tolerance are important risk factors for AD (Reitz et al., 2011; Livingston et al., 2017). Hyperglycemia, even without the development of diabetes, represents a risk factor for memory decline and AD (Crane et al., 2013). Diabetes was also reported to be an independent risk factor in patients with frontotemporal lobar degeneration (FTLD; Golimstok et al., 2014). In agreement, inducing glucose homeostasis impairments and diabetes exacerbate learning and memory defects as well as underlying pathology in different models reproducing the amyloid and tau lesions of AD (Takeda et al., 2010; Leboucher et al., 2013; for review see Wijesekara et al., 2018a). Puzzlingly, while impaired glucose homeostasis has been suggested to increase AD risk and associated lesions and particularly tau pathology, AD patients have been reported to exhibit altered glucose metabolism (Bucht et al., 1983; Fujisawa et al., 1991; Craft et al., 1992; Matsuzaki et al., 2010; Calsolaro and Edison, 2016; Tortelli et al., 2017) and to display an increased prevalence to develop type 2 diabetes (Janson et al., 2004; for review see Gratuze et al., 2018). It has been also reported that patients presenting the most common clinical phenotype of FTLD i.e., the behavioral variant or bvFTLD, among which one-half anatomo-pathologically present with tau aggregates (Pressman and Miller, 2014), exhibit increased fasting insulin levels and HOMA-IR index, a marker of insulin resistance, suggesting impaired glucose metabolism (Ahmed et al., 2014). The origin of these metabolic changes remains however unclear. However, at least for AD, the presence of tau pathology was described in brain regions known to control peripheral metabolism such as the hippocampus and hypothalamus (Schultz et al., 1999; Ishii and Iadecola, 2015; Soto et al., 2019) but also, surprisingly, in insulin-producing pancreatic β cells (Martinez-Valbuena et al., 2019).

We recently provided evidence, using a model of constitutive deletion, that tau is important for the control of peripheral energy homeostasis (Marciniak et al., 2017). We particularly showed that tau knock-out mice exhibit glucose homeostasis impairments, characterized by hyperinsulinemia and impaired glucose tolerance, that have been later replicated by other colleagues (Wijesekara et al., 2018b, 2021). In agreement, Wijesekara et al. (2021) recently demonstrated that human tau expression reversed glucose intolerance observed in tau

knock-out mice. Further, we associated the H1 tau haplotype with glucose homeostasis in humans (Marciniak et al., 2017). These observations raised the hypothesis that, overall, the pathological loss of tau function promotes glucose homeostasis impairments seen in AD patients. To address this question, in the present study, we have investigated the peripheral metabolic outcomes in a new knock-in model of tau loss-of-function, expressing mutated (P301L) human tau protein under the control of the endogenous murine *Mapt* promoter. Overall, our data report the vulnerability of tau knock-in mice to glucose metabolism alterations, supporting the prime function of tau dysfunctions to glucose dyshomeostasis described in AD.

MATERIALS AND METHODS

Human Samples

Human tissues were obtained in accordance with French bylaws (Good Practice Concerning the Conservation, Transformation, and Transportation of Human Tissue to be Used Therapeutically, published on 29 December 1998). Permission to use human tissues was obtained from the French Agency for Biomedical Research (Agence de la Biomedecine, Saint-Denis la Plaine, France, protocol no. PFS16-002) and the Lille Neurobank (DC-2008-642). To monitor tau isoforms in human islets, we used 3 mRNA samples obtained from TEBU-Bio (France). As control of tau isoform expression in the brain, we used mRNA extracted from the cortical area of one 29-year-old male individual who had donated his body to science. To evaluate tau expression in human islets by immunohistochemistry, we used pancreatic sections from a 77-year-old male obtained from Biochain¹ (T2234188, Hayward, CA).

Experimental Animals and Diet

Tau knock-in mice (tau KI; C57BL6/J background) were generated by knock-in targeted inserting way, into the murine locus *Mapt* gene, of a cDNA encoding human 1N4R isoform mutated at P301L and tagged with a V5 epitope (GKPIPPLLGLDST; this epitope tracks transgene expression) in exon 1 after initiation codon of protein translation (ATG). A Stop codon is present at the end of the human transgene as well as a poly(A) tail (Genoway, France; **Figure 1A**). Human tau expression in this KI model was assessed by Western blot. To obtain animals of interest, we crossed heterozygous tau KI male mice with heterozygous females tau KI animals to generate the homozygous tau KI mice and their littermate WT controls used for experiments. It is noteworthy that the body weight at weaning was similar in tau KI mice as compared to WT littermate (not shown). Animals were maintained in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12-h/12-h light/dark cycle, 22°C), with ad libitum access to food and water. The animals were maintained in compliance with European standards for the care and use of laboratory animals and experimental protocols approved by the local Animal Ethical Committee (agreement APAFIS# 12787-

¹<https://www.biochain.com/product/paraffin-tissue-section-human-adult-normal-pancreas/>

2015101320441671 v9 from CEEA75, Lille, France). Tau KI mice and WT littermates were fed with CHOW diet (SAFE D04; for composition see: https://safe-lab.com/safe-wAssets/docs/product-data-sheets/diets/safe_d04ds.pdf) or High-Fat Diet (HFD; 58% kCal from fat; Research Diets D12331; for composition see: <https://researchdiets.com/formulas/d12331>) from 2 months of age. Body weights were measured weekly. At the completion of the experiment (i.e., following 12w of diet), mice were about 5-month-old. The experimental workflow for metabolic observations is provided on **Supplementary Figure 1** and experiments are detailed below. Comparison of the metabolic phenotype of the KI mice with littermate WT was performed under chow diet in a first experiment; the effect of the HFD diet was evaluated in a second experiment. The HFD used is similar to what we published previously (Leboucher et al., 2019). This HFD was subjected to an initial evaluation of metabolic properties in WT littermate mice of the KI strain to ensure the ability to promote glucose intolerance.

Metabolic Cages

Spontaneous feeding, locomotor activity (total beam breaks/hour), respiratory exchange ratio, and O₂ consumption were monitored continuously for 24 h using metabolic cages (Phenomaster, TSE Systems, Germany). Food intake was measured by the integration of weighing sensors fixed at the top of the cage from which the food containers were suspended into the home cage. Locomotor activity was assessed using a metal frame placed around the cage. Evenly spaced infrared light beams are emitted along the x axis. Beam interruptions caused by movements of the animals are sensed and registered at high resolution. The sensors for detection of movement operate efficiently under both light and dark phases, allowing continuous recording. Metabolic rates were (Respiratory exchange ratio, O₂ consumption) measured by indirect calorimetry. Mice were housed individually and acclimated to the home cage for 72 h prior to experimental measurements.

Biochemical Plasma Parameters

Blood was collected at the tail vein after 6 h of morning fasting. Within 30 min of the collection of blood samples, blood was centrifuged at 1,500 g for 15 min at 4°C. Plasma was separated, transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes, and stored at -80°C until analysis. Plasma concentrations of insulin were measured using the mouse insulin ELISA kit (Mercodia AB, 10-1247-01; no cross-reactivity with proinsulin) following the manufacturer's instructions. Plasma concentrations of adiponectin were measured using a mouse Adiponectin ELISA kit (Invitrogen, KMP0041) following the manufacturer's instructions.

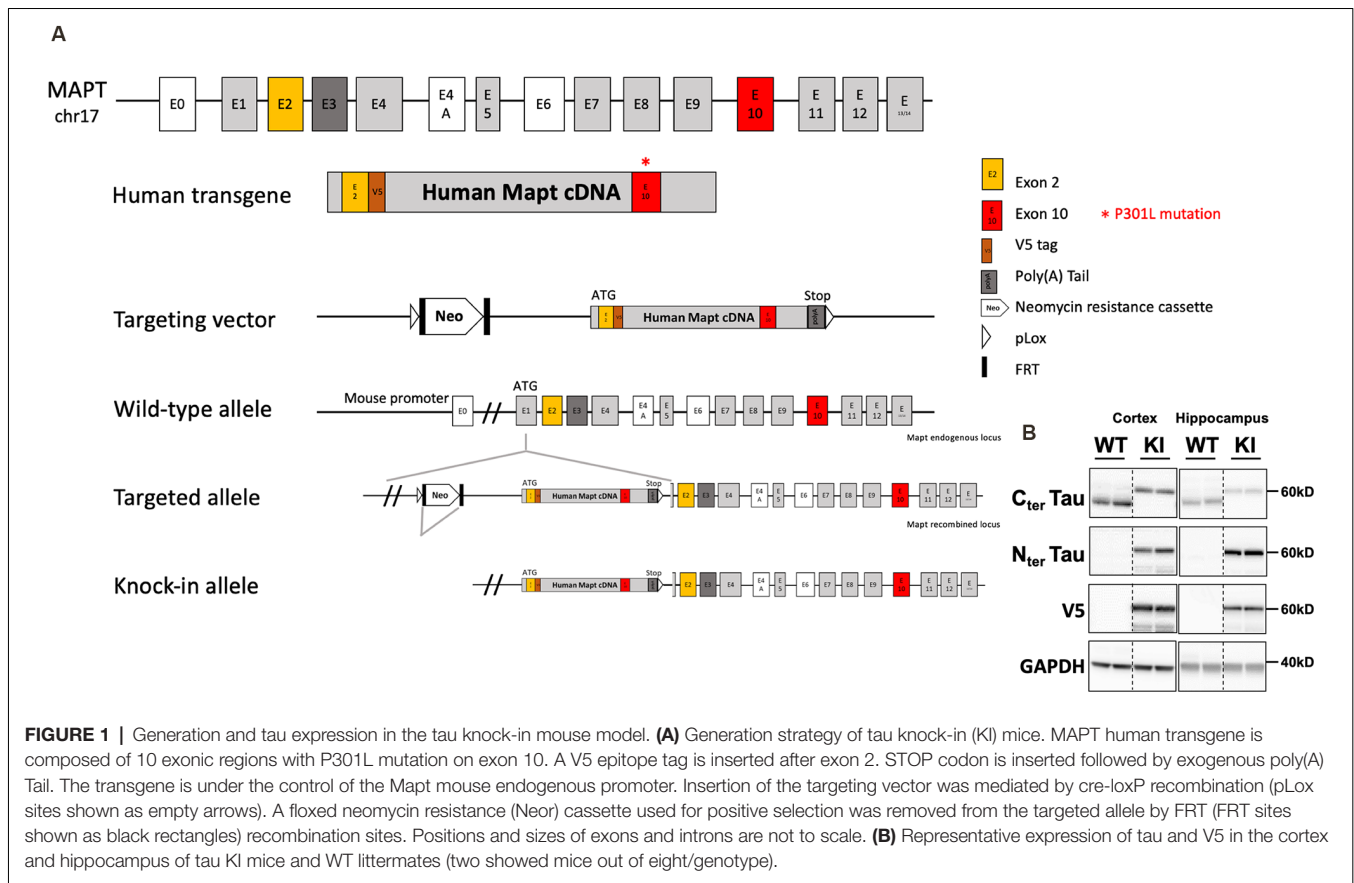
Metabolic Tolerance Tests

Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) were assessed following 6 h of morning fasting. D (+) glucose (1 g/kg; Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally. Blood glucose was then measured at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min following injection. For the pyruvate tolerance test (PTT), mice were fasted overnight and given an intraperitoneal injection of sodium pyruvate (2.0 g/kg) dissolved in sterile saline. Blood glucose

was then measured at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min following injection. For fasting-refeeding experiments, mice were fasted overnight (16 h of fast) and re-fed. Blood glucose was measured at 16 h (overnight) of fasting and during the 1st, 2nd, and 4th h after re-feeding. Blood glucose was measured at the tail vein after 6 h of morning fasting, an overnight fasting, and in fed or refeeding conditions using One Touch Verio Flex glucometer (LifeScan).

Tissue Fixation, Immunohistochemistry and Imaging

Animals were sacrificed by cervical dislocation. Following dissection, pancreases were laid flat in cassettes, fixed for 4 h in 4% paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin. Longitudinal serial sections (5 μm) were processed for immunofluorescent (IF) analysis. Tissue sections from human adult normal pancreas were obtained from Biochain (T2234188, Hayward, CA). Immunohistochemistry of the human pancreas was performed on 5 μm sections embedded in paraffin. The sections were de-paraffinized in three changes of toluene (5 min each) and re-hydrated in decreasing serial solutions of ethanol (100%, 95%, and 70%) and PBS. Sections were submitted to heat-induced antigen retrieval in citrate-buffer (10 mM citrate acid, 0.05% Tween 20 in distilled water), using microwave: two cycles for 5 and 10 min at power level 520 W and 160 W, respectively, followed by a 2 min break, cooled to room temperature for 20 min. Pancreatic tissue samples were incubated with blocking solution (5% goat serum and 1% BSA in PBS) for 1 h at RT, and washed once with PBS, then incubated with the primary anti-tau antibodies (laboratory-made mouse monoclonal IgG1 tau C-ter 9F6 raised against amino-acids (aas) 427–441, homemade mouse monoclonal IgG2b tau 9H12 raised against aas 162–175, for human sections a homemade mouse polyclonal IgG tau C-ter 993S5 raised against aas 394–408; see **Supplementary Figure 2**) diluted at 1:200 in antibody buffer (PBS, 1% BSA) overnight at +4°C. After washing in PBS, slides were incubated with the detecting secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 568 (IgG H + L, Highly Cross-Adsorbed Goat anti-Mouse, Invitrogen, A-1103, Darmstadt, Germany) diluted at 1:200 in antibody buffer for 1 h at RT. For detecting human tau in tau KI mice sections, a homemade rabbit monoclonal tau N-ter (hTauE1, raised against aas 12–21; **Supplementary Figure 2**) was used, diluted at 1:200 in antibody buffer (PBS, 1% BSA) 48 h at +4°C. Amplified immunohistochemistry processes were used. After washing in PBS, slides were incubated with Goat Anti-Rabbit IgG biotinylated secondary antibody (BA-1000-1.5), washed, and incubated with fluorophore-coupled streptavidin (Alexa Fluor™ 647 Conjugate, S32357) diluted at 1:600 in PBS. For detection of glucagon and insulin, slides were incubated with either a recombinant monoclonal Rabbit anti-glucagon antibody (Abcam, ab92517) diluted at 1:500 or a Polyclonal Guinea Pig Anti-insulin antibody ready-to-use (Agilent, IR00261-2) overnight at +4°C, followed by the secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 [for glucagon: IgG H + L, Highly Cross-Adsorbed Goat anti-Rabbit, Invitrogen, A32731,



Darmstadt, Germany; for insulin: IgG H + L, Highly Cross-Adsorbed Goat anti-Guinea Pig, A-11073, Darmstadt, Germany] diluted at 1:200 in antibody buffer (PBS, 1% BSA) for 1 h at RT. Nuclear counterstaining was performed using DAPI (Invitrogen). Sections were quenched for autofluorescence using the Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were mounted using Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent Technologies, California, USA). Immunofluorescence-stained slides were imaged using a Zeiss Spinning disk confocal microscopy with a 40× oil-immersion lens (NA 1.3 with an optical resolution of 176 nm). Images were processed with ZEN software (Carl Zeiss, version 14.0.0.201, Germany). Colocalizations between islet signals given using tau antibodies vs. insulin or glucagon were determined through Pearson's overlap coefficient using Image J (Adler and Parmryd, 2010).

Identification of 3R and 4R Tau Isoforms

Following mRNA extraction, one microliter of the RT-product was used as the template for subsequent PCR amplification. All PCR primers used in this study are reported in (Supplementary Table 1). Regarding mouse tau exon 10 splicing, we performed a nested PCR with TMF1/TMR1 primers to ensure the specificity of the PCR products obtained and a second PCR using TMF1/TRR2 primers. As internal controls, we used mouse or human cortex samples. The TMF1/TRR2 PCR products obtained

were resolved in an 1.75% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, pH 8.5).

Morphometric Analysis of Pancreatic Islets

Longitudinal pancreatic sections were cut at a 5 μm thickness, collected at 250 μm intervals, and plated on glass slides. This resulted in the collection of sections of 10 depths per pancreas. The sections were then proceeded as previously described (Rabhi et al., 2016). Sections were incubated with anti-glucagon and anti-insulin antibodies, followed by the secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 568 [IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Goat anti-Rabbit, A-11008, Darmstadt, Germany], and Alexa Fluor 488 [IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Goat anti-Guinea Pig, A-11073, Darmstadt, Germany], respectively. All images were acquired on a ZEISS Axio Scan.Z1 slide scanner (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) at ×20 magnification (resolution of 0.5 μm/pixel) and uploaded into a Spectrum digital slide interface. Images of whole pancreatic sections acquired were analyzed by a macro-based automated approach. First, pancreatic islets were detected by an automated approach using ImageJ software (Scion Software) based on immunofluorescence signal of insulin and glucagon. Then, to appreciate the relative mass of β and α cells in each detected pancreatic islet, the surface area of both insulin and glucagon positive cells was determined using the following equations:

B-cell surface area:

$$\frac{\left(\sum_{i=0}^n i = \% \text{ of insulin signal} \right)}{\left(\sum_{i=0}^n i \% \text{ of insulin and glucagon signals} \right)} \times 100$$

α cells surface area:

$$\frac{\left(\sum_{i=0}^n i = \% \text{ of glucagon signal} \right)}{\left(\sum_{i=0}^n i \% \text{ of insulin and glucagon signals} \right)} \times 100$$

Cell Culture, siRNA Knock-Down, and Glucose-Stimulated Insulin Secretion (GSIS)

The mouse pancreatic β -cell line Min6 (AddexBio) was cultured in DMEM (Gibco) with 15% fetal bovine serum, 100 mg/ml penicillin-streptomycin, and 55 μ M β -mercaptoethanol (Sigma, M6250). Cells were transfected with non-targeting siRNA mouse negative controls (siCont, D-001810-0X) and siTau (L-061561-01-0005, SMARTpool, Dharmacon) using Dharmafect1 (T-2001-03, GE Dharmacon) and GSIS experiments were performed 48 h later. For GSIS, following a 1 h preincubation in Krebs-HEPES-bicarbonate buffer (KHB; 140 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH_2PO_4 , 0.2 mM MgSO_4 , 1.5 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3) with 2.8 mM glucose, GSIS was assessed by static incubation of siCont and siTau transfected Min6 cells in KHB with 2.8 mM or 20 mM glucose for 1 h at 37°C. Mature insulin secreted into the media and total mature insulin content were quantified through insulin ELISA (Mercodia AB; no cross-reactivity with proinsulin) following the the manufacturer's instructions.

Pancreatic Islet Isolation and GSIS

Mouse islets were isolated by type V collagenase digestion (Sigma-Aldrich C9263, 1 mg/ml h) of the pancreas for 10 min at 37°C. After separation in a density-gradient medium (Histopaque-1119; Sigma-Aldrich), islets were handpicked. They were then cultured for 18–20 h at 37°C in a 95% air/5% CO_2 atmosphere in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) containing 10% FBS and 100 μ g/ml penicillin-streptomycin. GSIS experiments were performed as previously described (Rabhi et al., 2016). Briefly, approximately 30 islets were exposed to 2.8 mM glucose and 16.7 mM glucose in Krebs-Ringer buffer supplemented with HEPES (Sigma, 83264) and 0.5% fatty-acid free BSA (Sigma, A7030). Insulin released in the medium and total insulin content were measured using the mouse insulin ELISA kit (Mercodia AB; no cross-reactivity with proinsulin) following manufacturer's instructions.

Western Blot Analysis

Cortical brain and liver tissues, sampled at mouse sacrifice, were homogenized in a buffer Tris Base 10 mM; Sucrose 10%; pH = 7.4 with protease inhibitors (1 tablet for 10 ml solution—Sigma[®] Complete Mini EDTA Free). Protein amounts were evaluated using the BCA assay (Pierce[™] BCA Protein Assay

Kit). Protein lysates were then diluted with LDS (Lithium Dodecyl Sulfate) 2 \times supplemented with reducing agents (NuPAGE[®]), and then separated on 18-well 4–12% acrylamide gel (Criterion XT, Biorad). Twenty microgram of total proteins for cortex as the hippocampus and 40 μ g for liver were loaded per well. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, which were saturated with 5% nonfat dry milk or Bovine Serum Albumin in Tris 15 mmol/L, pH 8; NaCl 140 mmol/L and 0.05% Tween then incubated with primary (listed below) and secondary antibodies (PI-1000-1 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H + L), Peroxidase, Vector laboratories). Signals were visualized using chemiluminescence HRP substrate ECL kit (Amersham ECL Detection Reagents) and Amersham ImageQuant 800 imaging system (Cytiva). Results were normalized to GAPDH used as loading control, and quantifications were performed using ImageJ software. Anti-tau antibodies used for Western blot were Cter 9F6 and human tau-specific antibody Nter hTauE1 (**Supplementary Figure 2**). An antibody raised against V5 tag (GKPIPPLLGLDST) that was inserted on human transgene (catalog no. AB3792 Anti V5 Epitope Tag (Rabbit polyclonal; Millipore) has been used to specifically label the human transgene. Phospho-Akt(S473) and Akt(pan) antibodies (Cell signaling) were used on liver tissue. Loading control anti-GAPDH antibody (catalog no. G9545-200UL, Sigma[®]).

mRNA Extraction and Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNAs from human ($N = 3$) and mouse (WT, $N = 3$) isolated pancreatic islets, as well mouse cortex were extracted from tissues using the RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen, Courtabouef, France) following the manufacturer's instructions. Samples were quantified with a NanoDrop ND-1000. Five-hundred nanograms of total RNA were reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystem, Saint-Aubin, France). Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed on an Applied Biosystems[™] StepOnePlus[™] Real-Time PCR Systems using TaqMan[™] Gene Expression Master Mix (Life Technologies Corp., Grand Island, NY). The thermal cycler conditions were as follows: 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Predesigned Taqman[™] gene expression assays (Life Technologies Corp., Grand Island, NY) were used for mouse *Mapt* (Mm00521988_m1). Peptidylprolyl isomerase A (PPIA, Mm02342430_g1) expression was assessed as a reference housekeeping gene for normalization. Amplifications were carried out in duplicates and the relative expression of target genes was determined by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistics were performed using either Student's t-test as well as One or Two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a *post hoc* Tukey's test. We used Kruskal-Wallis when data failed a Kolmogorov-Smirnov or a Shapiro-Wilk normality test. Statistics were performed using Graphpad Prism Software. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

In the present study, we have performed a metabolic evaluation, focusing on glucose homeostasis, of tau KI mice in which the human 1N4R isoform mutated at P301L has been inserted at the locus of the mouse *Mapt* gene. Human tau expression was validated by western-blot analysis (Figure 1B). Noteworthy, similarly to other KI strains reported (Hashimoto et al., 2019; Saito et al., 2019), the present model does not exhibit tau aggregation at the age studied (2–5 months of age; not shown). This allowed us to evaluate the impact of an expression of soluble mutated (dysfunctional) tau proteins in absence of overexpression.

Metabolism of Tau KI Mice Is Not Impaired Under Chow Diet

In a first attempt, we investigated the phenotype of male animals under a chow diet. Among all parameters measured i.e., food intake, ambulatory activity, respiratory exchange ratio (RER), and energy expenditure—indirectly represented by oxygen consumption VO_2 - using metabolic cages (Supplementary Figures 3A–D), as well as fed and fasted glycemia, plasma insulin, body weight gain over a 3-month period (from 2 to 5 months of age), glucose tolerance or rectal temperature, no significant change could be observed (Supplementary Figures 3E–J). Therefore, under chow diet, tau KI mice did not exhibit altered basal energy homeostasis or glucose metabolism.

Impaired Glucose Metabolism in Tau KI Mice Under High-Fat Diet

In order to uncover a possible metabolic disorder related to the expression of the mutated human tau protein, we challenged tau KI male mice and their littermate controls with HFD for a period of 12 weeks, to promote the development of metabolic changes, approaching features of human metabolic syndrome or type 2 diabetes (Winzell and Ahren, 2004). HFD was given from 2 months of age, a time-point at which animals do not display any metabolic change in chow diet condition (Supplementary Figure 3). The time-line for metabolic investigations is given in Supplementary Figure 1.

First, we observed that the body weight gain was significantly, even moderately, increased in tau KI as compared to littermate WT (Figure 2A, reaching, at the completion of the experiment, i.e., after 12 weeks of HFD at 5 months of age, $39.0 \pm 3.1\%$ above the initial body weight (2 months of age) vs. $28.9 \pm 3.3\%$ in WT mice ($p < 0.05$, Student's t-test). In accordance with such enhanced body weight gain, we found, using metabolic cages, that tau KI mice exhibited an increased food intake (Figure 2B) without modification of locomotor activity (Figure 2C) nor energy expenditure (Figure 2D). The respiratory exchange ratio (RER) remained unaltered suggesting that under HFD, tau KI mice do not exhibit major energy metabolism nor change of energy substrate oxidation at the tissue level (Figure 2E).

Interestingly, further investigations were indicative of glucose homeostasis disturbances in tau KI as compared to littermate WT mice under HFD. While 6-h-fasting or fed glycemia remained unaltered by HFD (Figures 2F,G), insulinemia (Figure 2H)

as well as overnight fasting glycemia (Figure 2I) were found significantly enhanced in tau KI animals. Further, tau KI male mice fed under HFD also exhibited impaired glucose tolerance as assessed using the IPGTT (glucose tolerance) test (Figure 2J). Impaired glucose homeostasis was apparently not accompanied by peripheral insulin resistance since levels of liver pAkt, a downstream target of the insulin signaling pathway, remained similar between WT and tau KI animals (Supplementary Figure 4A). In line, levels of plasma adiponectin, an adipose tissue-secreted endogenous insulin sensitizer whose reduction is associated with insulin resistance, were not altered in tau KI mice (Supplementary Figure 4B).

Since tau KI animals have impaired glucose tolerance upon HFD, we next investigated whether insulin-producing β -cell mass could be altered. Indeed, increased β -cell mass may be indicative of an adaptive mechanism to impaired insulin secretion and therefore altered glucose homeostasis (Weir and Bonner-Weir, 2004). We thus evaluated the relative mass of α and β cells in pancreatic islets of WT and tau KI mice under HFD. Interestingly, enhanced insulinemia and glucose intolerance of tau KI mice under HFD were associated with an increased fraction of β -cell in the islets of tau KI mice as compared to WT littermates while glucagon-producing α -cells remained unaffected (Figure 3). The increase of β cell mass can be explained by the increase of both the number of pancreatic islets and the area of β -cells in KI mice. These data suggest that impaired glucose tolerance might relate to defective insulin secretion in response to glucose, more than a direct effect on beta cell mass.

Finally, to assess the possibility that hepatic glucose homeostasis could also be impaired in tau KI mice, animals were also challenged with pyruvate, a gluconeogenic precursor (Clementi et al., 2011). Pyruvate tolerance remained unaltered in tau KI mice as compared to their control littermates (Figure 2K) suggesting that liver glucose production was not associated with the glucose metabolic disturbances observed. Body temperature remained similar between genotypes (Figure 2L), possibly excluding gross thermogenesis alterations.

Importantly, we could uncover a sexual dimorphism in the glucose homeostasis impairments of tau KI mice since neither fasting glycemia, glucose tolerance nor body weight gain were affected in females KI mice under HFD as compared to their control littermates (Figures 2M–U). Altogether, the present data suggested that, when challenged with HFD, tau KI male mice exhibit significant glucose dyshomeostasis.

Tau Is Expressed by Insulin-Producing Cells of Mouse and Human Islets

Changes in insulin levels, glucose tolerance, and changes in β -cell mass observed in KI male mice point towards a potential link between tau and function of pancreatic β cells.

It is noteworthy that while tau is particularly enriched in the brain, *Mapt* mRNA expression in pancreatic mouse islets represents 10% of its level in the cortex (Figure 4A). This is in line with public single-cell RNA sequencing data reporting tau mRNA enrichment in pancreatic β cells (but also δ cells)

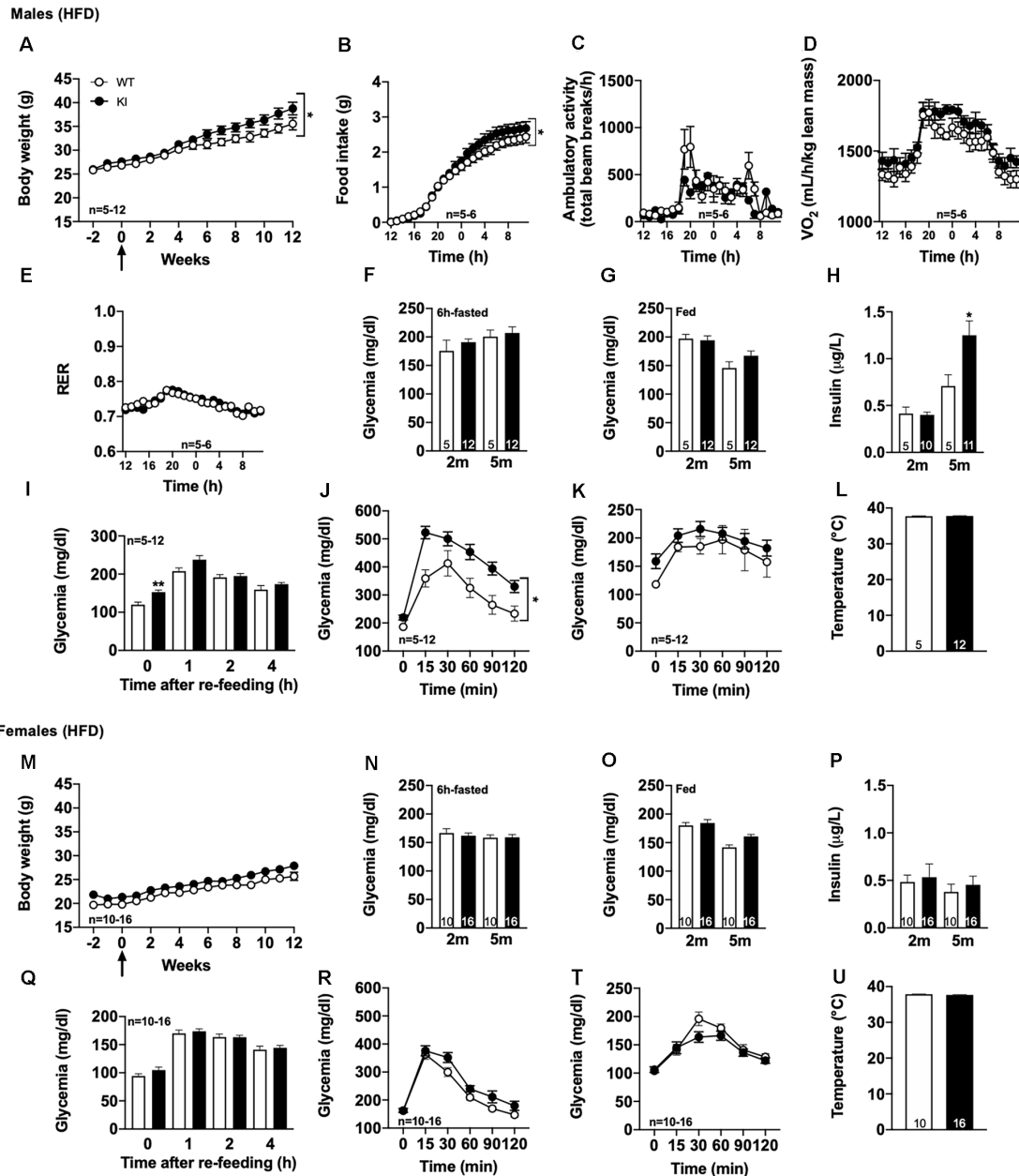
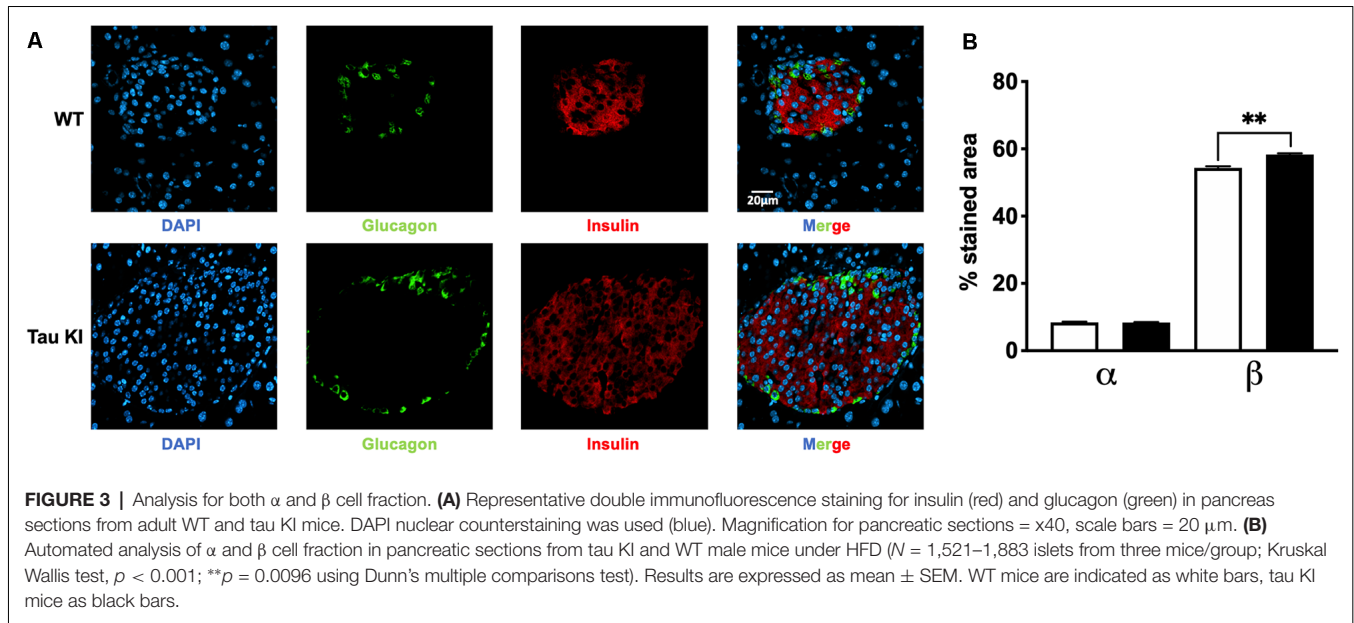


FIGURE 2 | Metabolic phenotyping of tau KI mice under High Fat diet (HFD; given from 2 to 5 months of age). **(A–L):** Males. **(A)** Body weight gain of WT and tau KI mice under HFD from 2 to 5 months of age (Two-Way ANOVA; $F_{(14,210)} = 1.807$, * $p < 0.05$ vs. WT). **(B–F)** Metabolic cage evaluation of tau KI male mice: **(B)** 24 h-cumulative food intake (g) (Two-Way ANOVA; $F_{(23,207)} = 2.401$, * $p < 0.05$ vs. WT). **(C)** 24 h spontaneous locomotor activity (total beam breaks/h). **(D)** 24 h-respiratory exchange ratio (RER = VCO_2/VO_2). **(E)** 24 h-O₂ consumption. **(F)** Glycemia after 6 h of fasting before (2 m) and at the completion of HFD (5 m; NS, One-Way ANOVA). **(G)** Glycemia in fed condition (9 a.m) before (2 m) and at the completion of HFD (5 m; NS, One-Way ANOVA). **(H)** Insulinemia after 6 h of fasting before (2 m) and at the completion of HFD (5 m; One-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test; $F_{(3,27)} = 13.34$ $p < 0.0001$; * $p < 0.05$ vs. WT). **(I)** Glycemic variations during the 1st, 2nd and 4th h following re-feeding after 16 h of fasting at the completion of the HFD, i.e., 5 months of age (One-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test; $F_{(7,60)} = 19.83$ $p < 0.0001$; * $p < 0.05$ vs. WT * $p < 0.05$ vs. WT for glycemia after 16 h). **(J)** Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) at completion of the HFD, i.e., 5 months of age (* $p < 0.05$, Two-Way ANOVA). **(K)** Pyruvate tolerance test (PTT) at completion of the HFD, i.e., 5 months of age (NS, Two-Way ANOVA). **(L)** Rectal temperature at the completion of the HFD, i.e., 5 months of age (NS, Student's t-test). **(M–U):** Females. **(M)** Body weight gain of WT and tau KI mice under HFD from 2 to 5 months of age (NS). **(N)** Glycemia after 6 h of fasting before (2 m) and at the completion of HFD (5 m; NS). **(O)** Glycemia in fed condition 9 a.m. before (2 m) and at the completion of HFD (5 m; NS). **(P)** Insulinemia after 6 h of fasting before (2 m) and at the completion of HFD (5 m; NS). **(Q)** Glycemic variations during the 1st, 2nd and 4th h following re-feeding after 16 h of fasting at the completion of the HFD, i.e., 5 months of age (NS). **(R)** Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) at the completion of the HFD, i.e., 5 months of age (NS). **(T)** Pyruvate tolerance test (PTT) at the completion of the HFD, i.e., 5 months of age (NS). **(U)** Rectal temperature at the completion of the HFD, i.e., 5 months of age (NS). Results are expressed as mean \pm SEM. WT mice are indicated as white circles/bars, tau KI mice as black circles/bars.



of pancreatic islets vs. α cells (Figures 4B–D; Segerstolpe et al., 2016). It is noteworthy that mouse islets expressed tau 4R isoforms (Supplementary Figure 5A) while human islets equally expressed both 3R and 4R tau isoforms (Supplementary Figure 5B), in agreement with brain expressions.

At the protein level, we investigated the expression of tau in the islets of WT and tau KI mice using various antibodies raised against the C-terminal (9F6) and the N-terminal (hTauE1) parts of tau (Figure 5, panels 1 and 2) as well as an antibody raised against the 162–175 amino-acids of tau (9H12; Supplementary Figure 6). We also evaluated the expression of tau in human islets (993S5 antibody; Figure 5, panels 3). In line with previous studies (Miklossy et al., 2010; Maj et al., 2010; Wijesekara et al., 2018b; Martinez-Valbuena et al., 2019), pancreatic islets from both WT and KI mice (9F6 and 9H12 antibodies; Figure 5, panel 1, C/H/C'/H'' and Supplementary Figures 6C,H,C'/H''), as well as humans (Figure 5, panel 3, B/F), expressed tau protein. As expected, pancreatic islets from tau KI but not WT mice expressed human tau (hTauE1 antibody; Figure 5, panel 2, C/H vs. C'/H''). The specificity of the signal in mouse samples was attested by the lack of signal found in the pancreatic islets from tau KO mice (Figure 5, panels 1 and 2, C'/H'; Supplementary Figures 6C',H'). The absence of signal was always observed when primary antibodies were omitted (data not shown and Supplementary Figures 6K–O,K'–O',K''–O'').

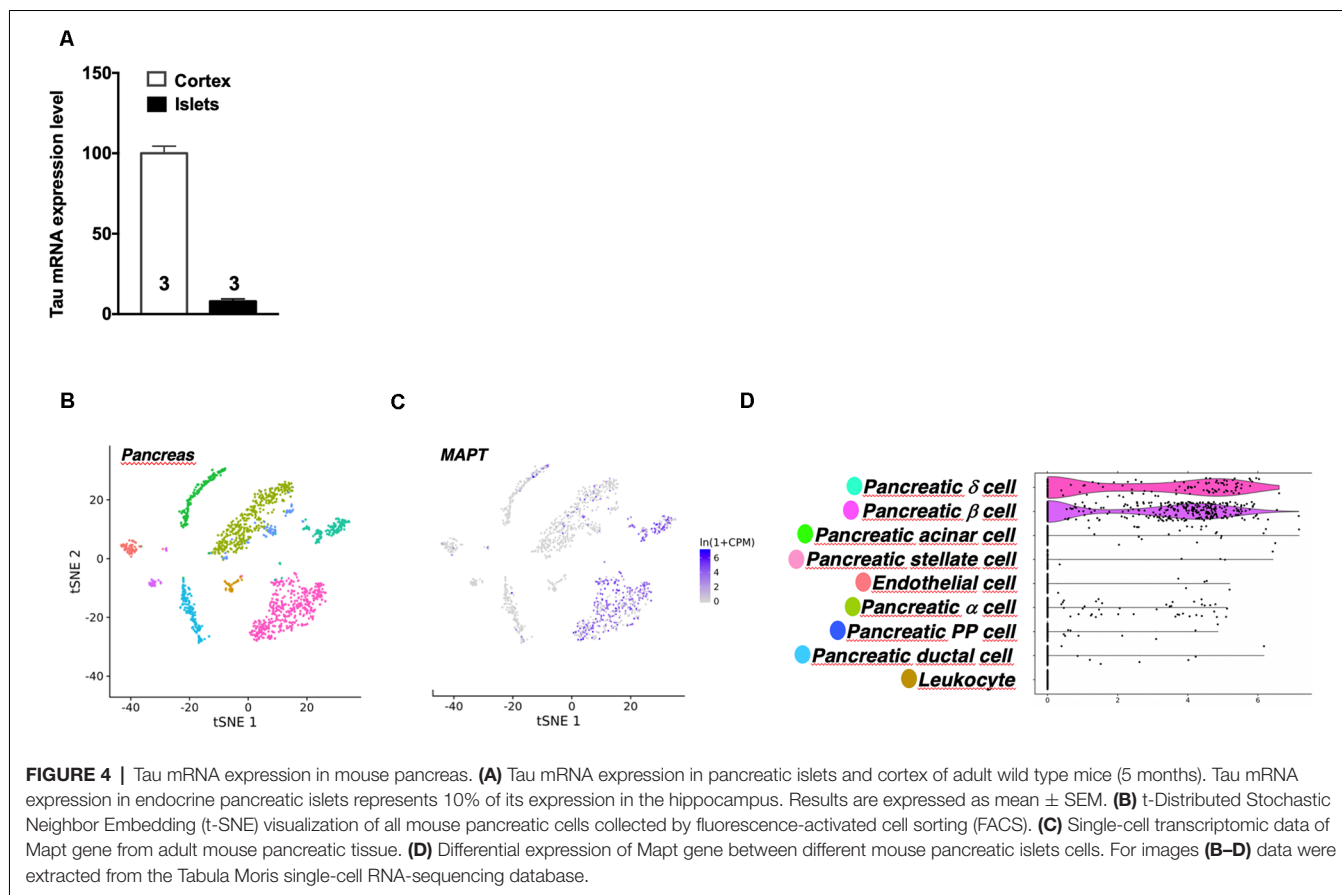
Importantly, in both mouse and human pancreatic islets, tau protein was clearly expressed by β cells, expressing insulin (Figure 5, panel 1, A–E,A''–E''; panel 2, A''–E''; panel 3, A–D; Supplementary Figures 6A–E,A''–H'') but not by α cells, expressing glucagon (Figure 5, panel 1, F–J/F''–J''; panel 2, F''–J''; panel 3, E–H; Supplementary Figures 6F–J,F''–J'').

To corroborate these observations, we performed an overlapping quantification using the Pearson's overlap coefficient as an index. The latter was determined using

ImageJ Software on confocal Z-stacks. In WT mice (9F6 antibody), the Pearson coefficient for insulin/tau was found to be 0.74 ± 0.01 ($n = 5$) while values for glucagon/tau were extremely low 0.0005 ± 0.0006 ($n = 5$). In KI mice (hTauE1 antibody), the Pearson coefficient for insulin/tau was found to be 0.81 ± 0.02 ($n = 5$) while values for glucagon/tau were extremely low 0.02 ± 0.0004 ($n = 5$). In human islet (993S5 antibody), values were found to be 0.90 ± 0.06 ($n = 3$) for insulin/tau colocalization, while 0.18 ± 0.05 for glucagon/tau. Together, these data strongly support that in pancreatic islets, tau protein is largely enriched in β cells.

Impaired Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Isolated Islets From Tau KI and KO Mice

To fully appreciate the functional impact of tau loss-of-function on tau KI mice to β -cell function, we evaluated glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in low and high glucose conditions from pancreatic islets isolated from WT, tau KI mice, and tau KO male mice, taken as a control. Although the level of insulin expressed by islets was not significantly different in KO and KI mice vs. WT (Figure 6A), constitutive tau deletion or expression of the mutated form in KI significantly impaired insulin secretion upon 16.7 mM glucose stimulation (Figure 6B). Noteworthy, using the mouse pancreatic β -cell line Min6, we could also observe that tau knock-down by siRNA significantly impaired GSIS (Supplementary Figure 7). Taken together, these results support that loss of tau function (knock-down, KO, or KI) impairs insulin secretion in response to glucose without affecting insulin content, suggestive of a direct effect of tau loss-of-function on insulin secretion rather than insulin biogenesis.



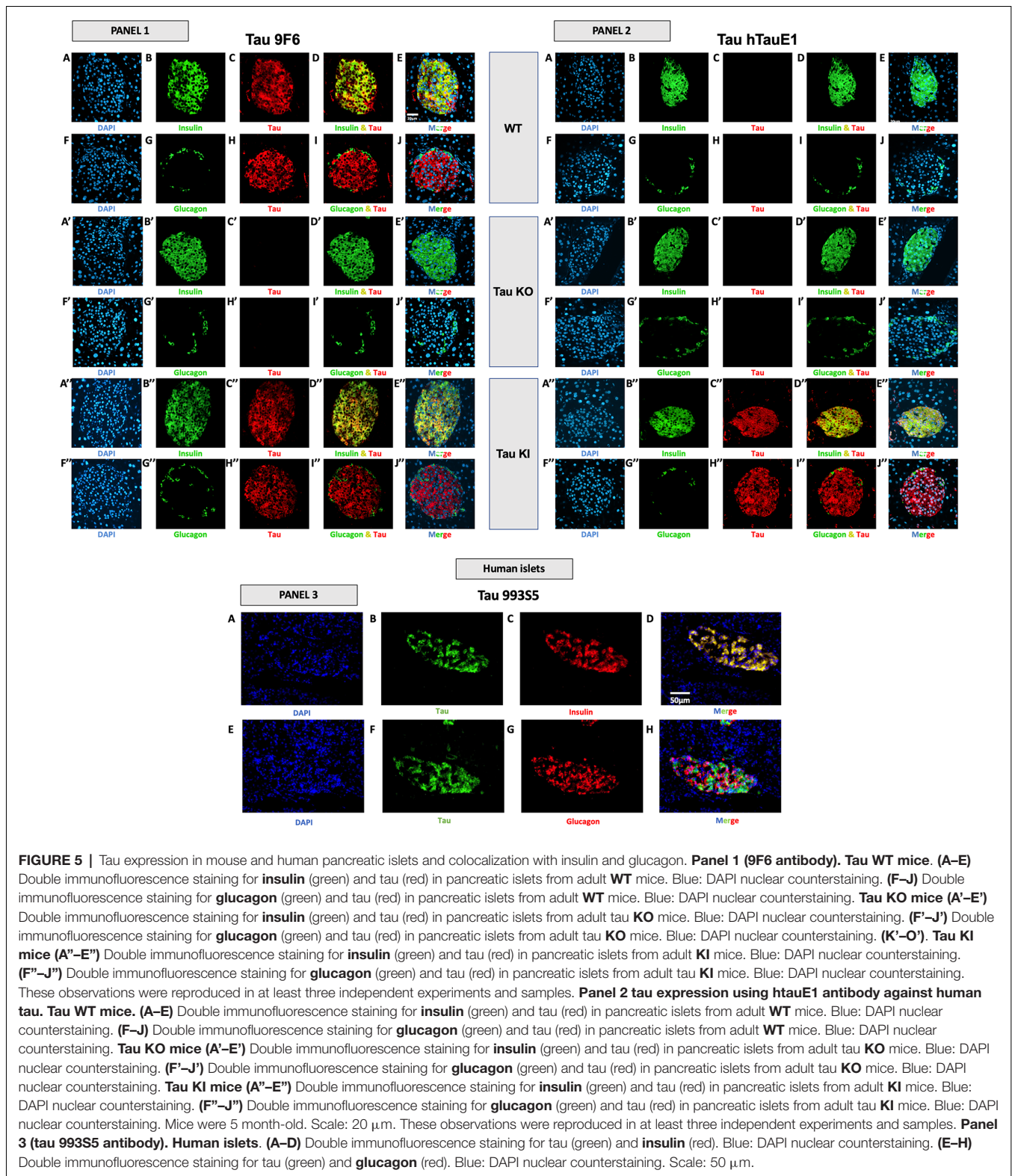
DISCUSSION

The origin of glucose homeostasis alterations in AD but also FTLN patients remains unclear (Bucht et al., 1983; Fujisawa et al., 1991; Craft et al., 1992; Janson et al., 2004; Matsuzaki et al., 2010; Ahmed et al., 2014; Calsolaro and Edison, 2016; Tortelli et al., 2017). Previous works, from our laboratory and others, using germline tau KO mice, supported that constitutive loss of tau function can lead to glucose homeostasis impairments (Marciniak et al., 2017; Wijesekara et al., 2018b, 2021). These data however are not sufficient to determine whether these changes solely relate to tau deletion, which is pathophysiologically irrelevant, or to the loss of some tau functions. To address more specifically this question, the principal microtubule-binding property of tau can be reduced by the insertion of mutations in the microtubules domains such as those described in FTLN with tau mutations. Therefore, to further address the link between tau and glucose homeostasis, we, therefore, used a novel knock-in tau mouse model expressing a mutated human tau protein, under the endogenous *Mapt* mouse gene promoter, allowing expression of a mutated human tau protein at a physiological level and thereby avoiding the biases of mouse models based on tau-overexpression (Leboucher et al., 2019) or constitutive deletion. This model was chosen to determine to which extent a loss of tau microtubule-binding activity due to P301L mutation (Delobel et al., 2002) was prone to recapitulate metabolic

impairments observed in tau KO animals. These investigations were performed at an age when the model does not exhibit any tau aggregation allowing us to evaluate the impact of the expression of a dysfunctional tau protein.

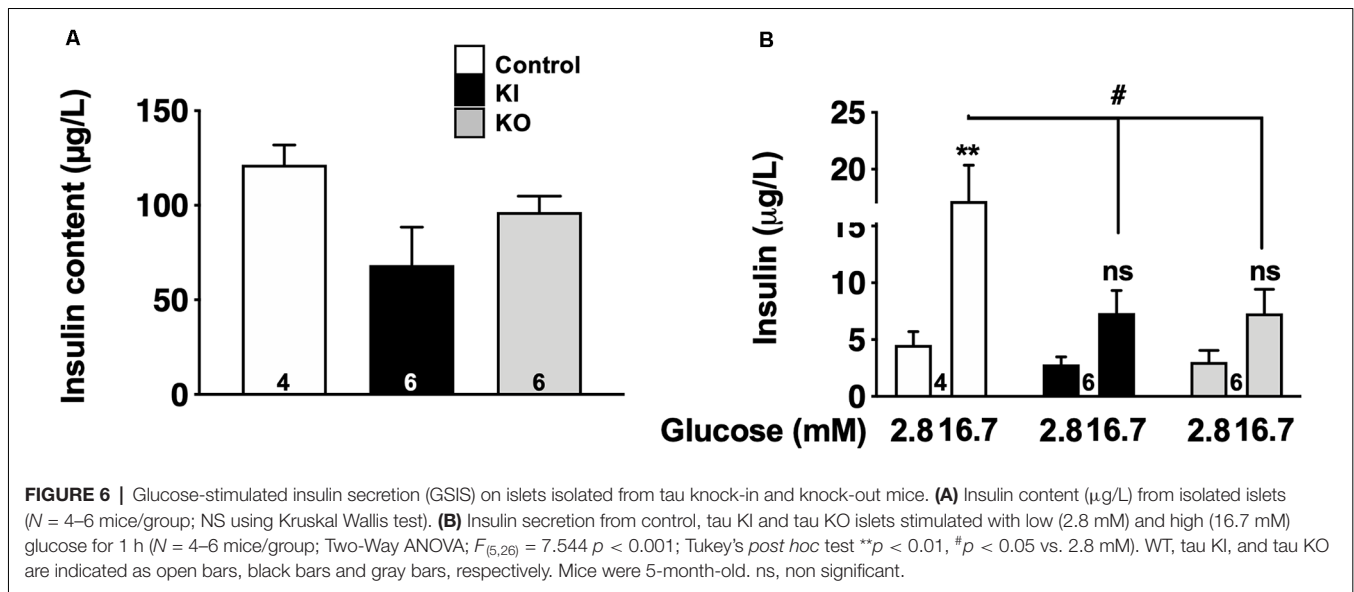
Our data demonstrate that expressing a mutated form of tau favors the development, in males, of glucose homeostasis impairments under metabolic stress (HFD), as exemplified by the significant increase in insulinemia as well as impaired glucose tolerance. The metabolic phenotype observed in tau KI mice under HFD mirrored what we and others previously observed in constitutive tau KO animals (Marciniak et al., 2017; Wijesekara et al., 2018b, 2021), likely suggesting that disturbances observed in tau KI and tau KO mice are likely ascribed to an impaired tau function such as the loss of microtubule-binding activity. This view is in agreement with the reversion of tau KO phenotype observed following re-expression of human tau as recently reported (Wijesekara et al., 2021). Nonetheless, glucose homeostasis defects have been observed in another tau KI model, where mutated tau sequence is inserted in the permissive HPRT site and expressed at the physiological level in the presence of murine tau, suggesting that metabolic dysregulations are not solely ascribed to tau loss-of-function and that mechanistic insights on the precise role of tau in the control of glucose homeostasis require additional molecular studies.

Our data support that glucose metabolism impairments seen in tau KI mice clearly involve pancreatic islets dysfunction



rather than insulin resistance. To evaluate insulin resistance, we analyzed phosphorylated serine/threonine kinase protein kinase B (pAkt) and circulating adiponectin, two key molecular

parameters that are impaired during insulin resistance. Indeed, insulin signaling in the liver or adipose tissue induces the phosphorylation of Akt and its subsequent activation. In several



models of insulin resistance, it has been shown that reduced glucose uptake is due to defects in insulin signaling (Ng et al., 2010; Huang et al., 2018) and is associated with impaired Akt phosphorylation, leading to the development of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes (Choi and Kim, 2010). Adiponectin is an adipose tissue-secreted endogenous insulin sensitizer, which plays a key role as a modulator of peroxisome proliferator-activated receptor γ action. Low levels of adiponectin, as observed in AdipoQ knockout mice or in patients affected by type 2 diabetes, have been associated with insulin resistance in diabetes (Ziemke et al., 2010). In our study, both pAkt and serum adiponectin concentrations were not significantly different between KI and WT mice fed with HFD, suggesting that insulin sensitivity was not impaired in our model. However, we provide clear evidence of the large enrichment of tau in insulin-producing β cells in WT, tau KI mice as well as the human pancreas. Second, we observed, in tau KI mice, a significant increase of β -cell mass (Figure 3) similar to what was previously reported during hyperglycemia and/or insulin resistance (Weir and Bonner-Weir, 2004). Third, this adaptation might relate to the impaired insulin secretion we observed in *ex vivo* experiments on isolated pancreatic islets; itself linked to a loss-of-function of mutated tau, these observations being replicated in isolated islets from tau KO mice as well as from tau knock-down in Min6 pancreatic cell line. Although it was already known that pancreas and islets of Langerhans expressed tau mRNA (Vanier et al., 1998; Maj et al., 2010), our data are the first reporting that isoforms expressed are a mix of 3R/4R or 4R only, in human and mouse islets respectively, in agreement with the brain profile. Previous studies suggested the presence of tau protein into human pancreatic β cells (Miklossy et al., 2010; Martinez-Valbuena et al., 2019). Our study is also the first to report the colocalization of tau with insulin but not glucagon in human islets. Other studies suggested that, in rat or mouse islets, tau colocalizes with insulin (Maj et al., 2010; Wijesekara et al., 2018b). Extending these primary findings,

our data unambiguously show, using several tau antibodies and proper controls (tau KO tissue combined with confocal microscopy) that, in the mouse, tau is selectively expressed by insulin but not glucagon-positive cells. Such demonstration was also important given a recent article (Zhou et al., 2020) suggesting that tau might not be expressed by pancreatic islets.

In vitro GSIS from isolated pancreatic islets from tau KO mice, consistent with previous observations (Wijesekara et al., 2018b), or tau KI mice, showed an impaired insulin secretion upon high glucose conditions. Altered GSIS was however not associated with a defective insulin production and/or decreased β -cell mass. Therefore, the machinery that controls insulin secretion in response to glucose is impaired in tau KI mice, probably contributing to hyperglycemia observed in these mice. In the context of glucose dyshomeostasis, such as during type 2 diabetes development, it is not fully inconsistent to observe both defective insulin secretion and increased fasting hyperglycemia and insulinemia (DeFronzo et al., 2015). Increased fasting plasma insulin levels, observed in tau KI mice, can be caused by a compensatory mechanism induced by hyperglycemia that leads to an increase of β -cell mass (Weir and Bonner-Weir, 2004). In addition, reduced insulin clearance is observed during HFD feeding and can contribute to maintaining elevated fasting insulinemia (Strömblad and Björntorp, 1986). Interestingly, studies in humans (Bonora et al., 1983) and animals (Kim et al., 2007) have shown that reduced insulin clearance can cooperate with elevated insulin secretion to regulate glucose homeostasis.

How tau regulates the ability to secrete insulin in response to high glucose remains unclear. Notably, microtubules play a major role in the intracellular trafficking of vesicles in endocrine cells like pancreatic β cells (Fourriere et al., 2020; Müller et al., 2021). A recent study demonstrated that high levels of glucose induce rapid microtubule disassembly mediated by tau hyperphosphorylation *via* glucose-responsive kinases, leading to tau dissociation from microtubules and favoring insulin secretion (Ho et al., 2020). Furthermore, in line with our

finding, it was reported recently that tau knockdown in mouse pancreatic β cells facilitated microtubule turnover, causing an increase of basal insulin secretion, depleting insulin vesicles from the cytoplasm, which subsequently impaired GSIS (Ho et al., 2020). Hence, in β cells, tau plays an important role in glucose-mediated insulin secretion. Considering that tau is more than a microtubule-associated protein (Sotiropoulos et al., 2017), and plays a role in chromatin organization and RNA metabolism (Galas et al., 2019), it is also possible that the impaired tau function also alters β cell function by other mechanisms.

An important observation of the present study is the sexual dimorphism in the ability of tau to regulate glucose homeostasis, with male tau KI mice being significantly more impacted than female littermates. Until then, previous works investigating the metabolic outcomes of tau deletion were only performed in males (Marciniak et al., 2017; Wijesekara et al., 2018b, 2021). Sex is known to impact the response to metabolic stress and β -cell engagement. Like in humans, where women are less likely than men to develop type 2 diabetes (Kautzky-Willer et al., 2016), female mice are more resistant to HFD than males (Oliveira et al., 2015) and manifest improved glucose tolerance, with greater insulin sensitivity in liver, muscles and adipose tissue (Goren et al., 2004). Conversely, male rodents exhibit a greater propensity for β cell failure (Gannon et al., 2018). Increased estrogen receptor signaling, differences in islet DNA methylation status, expression differences of antioxidant genes and of islet-enriched genes transcription factors have all been suggested as causes for these differences allowing females to tolerate HFD better than males (Liu and Mauvais-Jarvis, 2010; Osipovich et al., 2020 and references herein). In accordance, another important point that has not been addressed in the present study is the potential sexual-dimorphism of insulin secretion by isolated islets in response to glucose. Therefore the sex-related differences we uncovered in tau KI mice could be likely due to the action of sex hormones but also estrus cycle issues that will need to be further investigated. These data also highlight that tau is dispensable into the mechanisms underlying the protective influence of female hormones in mice.

Considering the presence of hyperphosphorylated and misconformed tau in the pancreatic islets of patients with type 2 diabetes and patients with AD (Miklossy et al., 2010; Martinez-Valbuena et al., 2019), it is likely that glucose homeostasis impairments seen in latter are, at least in part, related to tau loss of microtubule-binding activity. Nonetheless, it is probable that glucose metabolism impairments of AD patients likely arise from a synergistic impact of both pancreatic tau pathology and amyloidosis. Indeed, A β has been shown to deposit in the pancreas of both humans and APP mouse models (Miklossy et al., 2010; Vandal et al., 2014; Wijesekara et al., 2017). This is in agreement with the glucose homeostasis impairments seen in the latter (Takeda et al., 2010; Mody et al., 2011; Vandal et al., 2015; for review see Wijesekara et al., 2018a). Regarding AD patients but also individuals with FTLN, we cannot rule out that besides β cells, other peripheral organs or brain structures are involved in their glucose metabolism impairments. Indeed, tau is physiologically expressed by skeletal muscle or kidney (Gu et al., 1996; Caillet-Boudin

et al., 2015; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186868-MAPT/tissue>), both involved in glucose homeostasis (Gerich, 2010; Triplitt, 2012), even if, to the best of our knowledge, tau hyperphosphorylation/misconformation has not been described at these locations. However, tau misconformation, and therefore tau loss-of-function, is well observed in brain regions such as the hippocampus and hypothalamus, known to control glucose homeostasis (Schultz et al., 1999; Ishii and Iadecola, 2015; Soto et al., 2019). The relative contribution of the pancreas and the brain area in controlling peripheral glucose homeostasis warrants further investigations using tissue-specific conditional expression approaches allowing cell-specific loss of tau function.

Finally, regardless of whether pancreatic β cells or brain area are primarily involved in glucose metabolism impairments seen in AD and FTLN patients, considering that diabetes and impaired glucose tolerance are important risk factors for both (Reitz et al., 2011; Golimstok et al., 2014; Livingston et al., 2017) and that both exacerbate learning and memory defects and underlying pathology in different models reproducing the amyloid and tau lesions (Takeda et al., 2010; Lebouche et al., 2013; for review see Wijesekara et al., 2018a), glucose metabolism deficits promoted by both tau and amyloid lesions would then be part of a detrimental circle that would ultimately favor cognitive decline. Moreover, such a mutual relationship between glucose homeostasis disturbance and AD, with probably common pathophysiological mechanisms, requires a change in public health policies by focusing more on primary prevention of common risk factors for diabetes and AD. General public awareness is needed about the risk of developing these two diseases, and the importance of correcting modifiable risk factors, such as healthier eating, weight loss, and increased physical activity. Furthermore, investigating and pharmacologically managing glucose homeostasis deficits at an early pathological stage of AD or FTLN patients would be then of clinical interest in cross-consultations between neurology and endocrinology departments.

In summary, the present study highlights that knock-in expression of a mutated tau protein favors the development of glucose metabolism impairments and pancreatic β -cell dysfunction upon metabolic stress, supporting not only a role of tau pathology in the development of metabolic disturbances in AD and FTLN patients but providing new insights on the physiological role of tau in the control of peripheral metabolism.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by French Agency for Biomedical Research (Agence de la Biomedecine, Saint-Denis la Plaine, France, protocol no. PFS16-002) and the Lille Neurobiobank (DC-2008-642). The patients/participants provided their written informed consent to

participate in this study. The animal study was reviewed and approved by CEEA75.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: HB, AM-T, SL, KB, NS, J-SA, LB, DV, DB, and VB-S. Experiments: HB, SK, ECa, SE, CB, EF, LR, ECo, MB, FO, TB, KC, BT, TG, EN, VG-M, ABon, and ABog. Data analysis: HB, SK, EC, SE, CB, J-SA, DV, DB, and NS. Funding acquisition: J-SA, LB, and DB. Supervision: J-SA, LB, DV, DB, and VB-S. Writing—original draft: HB, SK, J-SA, DV, DB, LB, and VB-S. Writing—review and editing: all. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from Programmes d'Investissements d'Avenir LabEx (excellence laboratory) DISTALZ Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease and EGID (European Genomic Institute for Diabetes ANR-10-LABX-46). Our laboratories are also supported by ANR (GRAND to LB, ADORATAU, ADORASTRAU, METABOTAU to DB, and BETAPLASTICITY to J-SA), COEN (5008), Fondation pour la Recherche Médicale, France Alzheimer/Fondation de

REFERENCES

- Adler, J., and Parmryd, I. (2010). Quantifying colocalization by correlation : the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry A* 77, 733–742. doi: 10.1002/cyto.a.20896
- Ahmed, R. M., MacMillan, M., Bartley, L., Halliday, G. M., Kiernan, M. C., Hodges, J. R., et al. (2014). Systemic metabolism in frontotemporal dementia. *Neurology* 83, 1812–1818. doi: 10.1212/WNL.0000000000000993
- Ahmed, T., Blum, D., Burnouf, S., Demeyer, D., Buée-Scherrer, V., D'Hooge, R., et al. (2015). Rescue of impaired late-phase long-term depression in a tau transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 36, 730–739. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.015
- Biundo, F., Del Prete, D., Zhang, H., Arancio, O., and D'Adamio, L. (2018). A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity. *Sci. Rep.* 8:3184. doi: 10.1038/s41598-018-21596-3
- Bonora, E., Zavaroni, I., Coscelli, C., and Butturini, U. (1983). Decreased hepatic insulin extraction in subjects with mild glucose intolerance. *Metabolism* 32, 438–446. doi: 10.1016/0026-0495(83)90004-5
- Bucht, G., Adolfsson, R., Lithner, F., and Winblad, B. (1983). Changes in blood glucose and insulin secretion in patients with senile dementia of Alzheimer type. *Acta Med. Scand.* 213, 387–392. doi: 10.1111/j.0954-6820.1983.tb03756.x
- Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N., and Lefebvre, B. (2015). Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.* 10:28. doi: 10.1186/s13024-015-0025-8
- Calsolaro, V., and Edison, P. (2016). Alterations in glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Recent Patents. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 10, 31–39. doi: 10.2174/1872214810666160615102809
- Choi, K., and Kim, Y. B. (2010). Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J. Intern. Med.* 25, 119–129. doi: 10.3904/kjim.2010.25.2.119
- Clementi, A. H., Gaudy, A. M., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., and Mooney, R. A. (2011). Deletion of interleukin-6 improves pyruvate tolerance without altering hepatic insulin signaling in the leptin receptor-deficient mouse. *Metabolism* 60, 1610–1619. doi: 10.1016/j.metabol.2011.04.004
- France, FHU VasCog research network (Lille, France), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSO to J-SA), Fondation Plan Alzheimer as well as Inserm, CNRS, Université Lille, Lille Métropole Communauté Urbaine. HB received a research fellowship from Agence Régionale de Santé Hauts-de-France, the SFD (Société Francophone du Diabète), and INSERM (Poste d'accueil pour praticien). SK received a doctoral scholarship from LabEx DISTALZ. VG-M was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20160936000).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS)—UMS 2014—US 4: Animal Facilities (F-59000 Lille, France; F-67000 Strasbourg, France): Animal Facilities and BioImaging Center of Lille. We also warmly acknowledge Marie-Hélène Gevaert for her fruitful collaboration in performing the histological preparation. We thank Céline Brand, Sophie Lesage, and Nathalie Perrais for great administrative support.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2022.841892/full#supplementary-material>.

- Colin, M., Dujardin, S., Schraen-Maschke, S., Meno-Tetang, G., Duyckaerts, C., Courade, J.-P., et al. (2020). From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol.* 139, 3–25. doi: 10.1007/s00401-019-02087-9
- Craft, S., Zallen, G., and Baker, L. D. (1992). Glucose and memory in mild senile dementia of the Alzheimer type. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 14, 253–267. doi: 10.1080/01688639208402827
- Crane, P. K., Walker, R., Hubbard, R. A., Li, G., Nathan, D. M., Zheng, H., et al. (2013). Glucose levels and risk of dementia. *N. Engl. J. Med.* 369, 540–548. doi: 10.1056/NEJMoa1215740
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., et al. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1:15019. doi: 10.1038/nrdp.2015.19
- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Jakes, R., Rousseau, A., Delacourte, A., et al. (2002). Functional characterization of FTDP-17 tau gene mutations through their effects on Xenopus oocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 277, 9199–9205. doi: 10.1074/jbc.M107716200
- Fourriere, L., Jimenez, A. J., Perez, F., and Boncompain, G. (2020). The role of microtubules in secretory protein transport. *J. Cell Sci.* 133:jcs.237016. doi: 10.1242/jcs.237016
- Fujisawa, Y., Sasaki, K., and Akiyama, K. (1991). Increased insulin levels after OGTT load in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with dementia of Alzheimer type. *Biol. Psychiatry* 30, 1219–1228. doi: 10.1016/0006-3223(91)90158-i
- Galas, M.-C., Bonnefoy, E., Buee, L., and Lefebvre, B. (2019). “Emerging connections between tau and nucleic acids,” in *Tau Biology, Advances in Experimental Medicine and Biology*, eds A. Takashima, B. Wolozin, and L. Buee (Singapore: Springer Singapore), 135–143. doi: 10.1007/978-981-32-9358-8_12
- Gannon, M., Kulkarni, R. N., Tse, H. M., and Mauvais-Jarvis, F. (2018). Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. *Mol. Metab.* 15, 82–91. doi: 10.1016/j.molmet.2018.05.017
- Gerich, J. E. (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet. Med.* 27, 136–142. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x

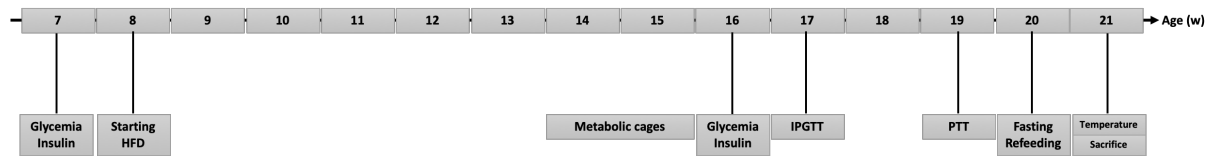
- Golimstok, A., Cámpora, N., Rojas, J. I., Fernandez, M. C., Elizondo, C., Soriano, E., et al. (2014). Cardiovascular risk factors and frontotemporal dementia: a case-control study. *Transl. Neurodegener.* 3:13. doi: 10.1186/2047-9158-3-13
- Goren, H. J., Kulkarni, R. N., and Kahn, C. R. (2004). Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: C57BL/6, C57BLKS/6, DBA/2 and 129X1. *Endocrinology* 145, 3307–3323. doi: 10.1210/en.2003-1400
- Gratuzze, M., Joly-Amado, A., Vieau, D., Buée, L., and Blum, D. (2018). Mutual relationship between tau and central insulin signalling: consequences for AD and tauopathies? *Neuroendocrinology* 107, 181–195. doi: 10.1159/000487641
- Gu, Y., Oyama, F., and Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* 67, 1235–1244. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x
- Hashimoto, S., Matsuba, Y., Kamano, N., Mihira, N., Sahara, N., and Takano, J., et al. (2019). Tau binding protein CAPON induces tau aggregation and neurodegeneration. *Nat Commun.* 10:2394. doi: 10.1038/s41467-019-10278-x
- Ho, K.-H., Yang, X., Osipovich, A. B., Cabrera, O., Hayashi, M. L., Magnuson, M. A., et al. (2020). Glucose regulates microtubule disassembly and the dose of insulin secretion via tau phosphorylation. *Diabetes* 69, 1936–1947. doi: 10.2337/db19-1186
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., and Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1483–1496. doi: 10.7150/ijbs.27173
- Ishii, M., and Iadecola, C. (2015). Metabolic and non-cognitive manifestations of Alzheimer's disease: the hypothalamus as both culprit and target of pathology. *Cell Metab.* 22, 761–776. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.016
- Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J. E., O'Brien, P., Petersen, R. C., and Butler, P. C. (2004). Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53, 474–481. doi: 10.2337/diabetes.53.2.474
- Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., and Pacini, G. (2016). Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* 37, 278–316. doi: 10.1210/er.2015-1137
- Kim, S. P., Ellmerer, M., Kirkman, E. L., and Bergman, R. N. (2007). Beta-cell “rest” accompanies reduced first-pass hepatic insulin extraction in the insulin-resistant, fat-fed canine model. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1581–E1589. doi: 10.1152/ajpendo.00351.2006
- Leboucher, A., Ahmed, T., Caron, E., Tailleux, A., Raison, S., Joly-Amado, A., et al. (2019). Brain insulin response and peripheral metabolic changes in a tau transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 125, 14–22. doi: 10.1016/j.nbd.2019.01.008
- Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F. J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., et al. (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on τ pathology are independent of insulin resistance in τ transgenic mice. *Diabetes* 62, 1681–1688. doi: 10.2337/db12-0866
- Liu, S., and Mauvais-Jarvis, F. (2010). Estrogenic protection of beta-cell failure in metabolic diseases. *Endocrinology* 151, 859–864. doi: 10.1210/en.2009-1107
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., et al. (2017). Dementia prevention, intervention and care. *Lancet* 390, 2673–2734. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31363-6
- Maeda, S., and Mucke, L. (2016). Tau phosphorylation—much more than a biomarker. *Neuron* 92, 265–267. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.011
- Maj, M., Gartner, W., Ilhan, A., Neziri, D., Attems, J., and Wagner, L. (2010). Expression of TAU in insulin-secreting cells and its interaction with the calcium-binding protein secretogogin. *J. Endocrinol.* 205, 25–36. doi: 10.1677/JOE-09-0341
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., et al. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J. Exp. Med.* 214, 2257–2269. doi: 10.1084/jem.20161731
- Martinez-Valbuena, I., Valenti-Azcarate, R., Amat-Villegas, I., Riverol, M., Marcilla, I., Andrea, C. E., et al. (2019). Amylin as a potential link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 86, 539–551. doi: 10.1002/ana.25570
- Matsuzaki, T., Sasaki, K., Tanizaki, Y., Hata, J., Fujimi, K., Matsui, Y., et al. (2010). Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the hisayama study. *Neurology* 75, 764–770. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ee25f
- Miklossy, J., Qing, H., Radenovic, A., Kis, A., Vilen, B., László, F., et al. (2010). Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiol. Aging* 31, 1536–1515. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.019
- Mody, N., Agouni, A., McIlroy, G. D., Platt, B., and Delibegovic, M. (2011). Susceptibility to diet-induced obesity and glucose intolerance in the APP (SWE)/PSEN1 (A246E) mouse model of Alzheimer's disease is associated with increased brain levels of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and retinobinding protein 4 (RBP4) and basal phosphorylation of S6 ribosomal protein. *Diabetologia* 54, 2143–2151. doi: 10.1007/s00125-011-2160-2
- Müller, A., Schmidt, D., Xu, C. S., Pang, S., D'Costa, J. V., Kretschmar, S., et al. (2021). 3D FIB-SEM reconstruction of microtubule-organelle interaction in whole primary mouse β cells. *J. Cell Biol.* 220:e202010039. doi: 10.1083/jcb.202010039
- Ng, Y., Ramm, G., and James, D. E. (2010). Dissecting the mechanism of insulin resistance using a novel heterodimerization strategy to activate akt. *J. Biol. Chem.* 285, 5232–5239. doi: 10.1074/jbc.M109.060632
- Oliveira, R. B., Maschio, D. A., Carvalho, C. P., and Collares-Buzato, C. B. (2015). Influence of gender and time diet exposure on endocrine pancreas remodeling in response to high fat diet-induced metabolic disturbances in mice. *Ann. Anat.* 200, 88–97. doi: 10.1016/j.aanat.2015.01.007
- Osipovich, A. B., Stancill, J. S., Cartailier, J. P., Dudek, K. D., and Magnuson, M. A. (2020). Excitotoxicity and overnutrition additively impair metabolic function and identity of pancreatic β -cells. *Diabetes* 69, 1476–1491. doi: 10.2337/db19-1145
- Pressman, P. S., and Miller, B. L. (2014). Diagnosis and management of behavioral variant frontotemporal dementia. *Biol. Psychiatry* 75, 574–581. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.11.006
- Rabhi, N., Denechaud, P.-D., Gromada, X., Hannou, S. A., Zhang, H., Rashid, T., et al. (2016). KAT2B is required for pancreatic beta cell adaptation to metabolic stress by controlling the unfolded protein response. *Cell Rep.* 15, 1051–1061. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.079
- Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 137–152. doi: 10.1038/nrneuro.2011.2
- Saito, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Narasimhan, S., et al. (2019). Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *J. Biol. Chem.* 294, 12754–12765. doi: 10.1074/jbc.RA119.009487
- Schultz, C., Ghebremedhin, E., Braak, E., and Braak, H. (1999). Sex-dependent cytoskeletal changes of the human hypothalamus develop independently of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 160, 186–193. doi: 10.1006/exnr.1999.7185
- Segerstolpe, A., Palasantza, P., Eliasson, P., Andersson, E. M., Andréasson, A. C., Sun, X., et al. (2016). Single-cell transcriptome profiling of human pancreatic islets in health and type 2 diabetes. *Cell Metab.* 24, 593–607. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.020
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert. Rev. Proteomics* 5, 207–224. doi: 10.1586/14789450.5.2.207
- Sotiropoulos, I., Galas, M.-C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., et al. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated tau protein. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:91. doi: 10.1186/s40478-017-0489-6
- Soto, M., Cai, W., Konishi, M., and Kahn, C. R. (2019). Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 6379–6384. doi: 10.1073/pnas.1817391116
- Strömblad, G., and Björntorp, P. (1986). Reduced hepatic insulin clearance in rats with dietary-induced obesity. *Metabolism* 35, 323–327. doi: 10.1016/0026-0495(86)90148-4
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., et al. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 7036–7041. doi: 10.1073/pnas.1000645107
- Tortelli, R., Lozupone, M., Guerra, V., Barulli, M. R., Imbimbo, B. P., Capozzo, R., et al. (2017). Midlife metabolic profile and the risk of late-life cognitive decline. *J. Alzheimers Dis.* 59, 121–130. doi: 10.3233/JAD-170153
- Triplitt, C. L. (2012). Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. *Am. J. Manag. Care* 18, S11–16.
- Van der Jeugd, A., Vermaercke, B., Derisbourg, M., Lo, A. C., Hamdane, M., Blum, D., et al. (2013). Progressive age-related cognitive decline in tau mice. *J. Alzheimers Dis.* 37, 777–788. doi: 10.3233/JAD-130110

- Vandal, M., White, P. J., Chevrier, G., Tremblay, C., St-Amour, I., Planel, E., et al. (2015). Age-dependent impairment of glucose tolerance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 29, 4273–4284. doi: 10.1096/fj.14-268482
- Vandal, M., White, P. J., Tremblay, C., St-Amour, I., Chevrier, G., Emond, V., et al. (2014). Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes* 63, 4291–4301. doi: 10.2337/db14-0375
- Vanier, M. T., Neuville, P., Michalik, L., and Launay, J. F. (1998). Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J. Cell Sci.* 111, 1419–1432. doi: 10.1242/jcs.111.10.1419
- Velazquez, R., Ferreira, E., Tran, A., Turner, E. C., Belfiore, R., Branca, C., et al. (2018). Acute tau knockdown in the hippocampus of adult mice causes learning and memory deficits. *Aging Cell* 17:e12775. doi: 10.1111/acer.12775
- Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53, S16–21. doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s16
- Wijesekara, N., Ahrens, R., Sabale, M., Wu, L., Ha, K., Verdile, G., et al. (2017). Amyloid-beta and islet amyloid pathologies link Alzheimer's disease and type 2 diabetes in a transgenic model. *FASEB J.* 31, 5409–5418. doi: 10.1096/fj.201700431R
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2018a). Impaired peripheral glucose homeostasis and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 136, 172–181. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.027
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., Ahrens, R., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2018b). Tau ablation in mice leads to pancreatic β cell dysfunction and glucose intolerance. *FASEB J.* 32, 3166–3173. doi: 10.1096/fj.201701352
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., Ahrens, R., Ha, K., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2021). Combination of human tau and islet amyloid polypeptide exacerbates metabolic dysfunction in transgenic mice. *J. Pathol.* 254, 244–253. doi: 10.1002/path.5674
- Winzell, M. S., and Ahren, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53, S215–S219. doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s215
- Zhou, R., Hu, W., Dai, C. L., Gong, C. X., Iqbal, K., Zhu, D., et al. (2020). Expression of microtubule associated protein tau in mouse pancreatic islets is restricted to autonomic nerve fibers. *J. Alzheimers Dis.* 75, 1339–1349. doi: 10.3233/JAD-200101
- Ziemke, F., Christos, S., and Mantzoros, C. S. (2010). Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 258S–261S. doi: 10.3945/ajcn.2009.28449C

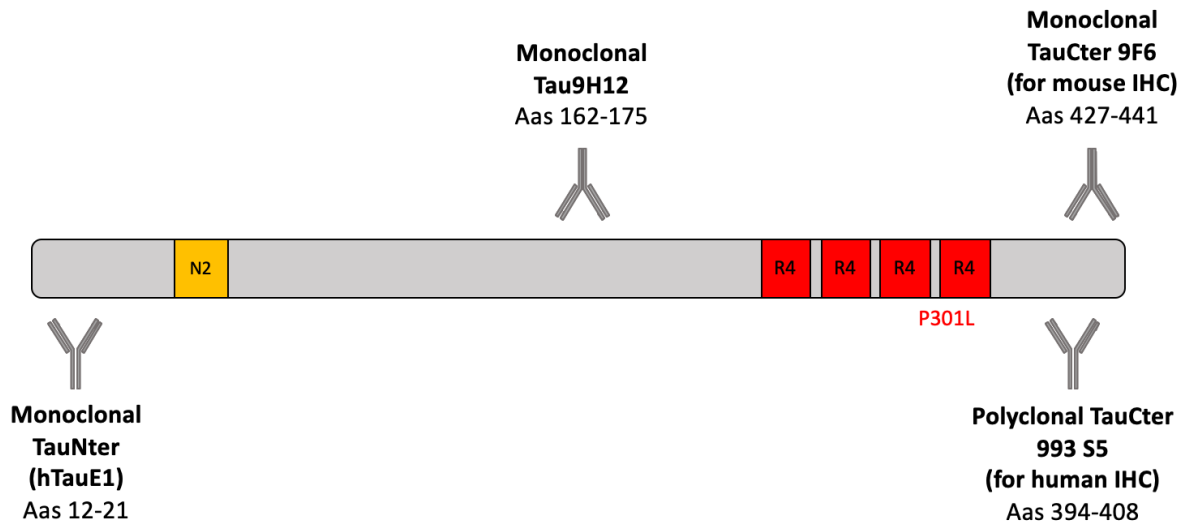
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Benderradji, Kraiem, Courty, Eddarkaoui, Bourouh, Faivre, Rolland, Caron, Besegher, Oger, Boschetti, Carvalho, Thiroux, Gauvrit, Nicolas, Gomez-Murcia, Bogdanova, Bongiovanni, Muhr-Tailleux, Lancel, Bantubungi, Sergeant, Annicotte, Buée, Vieau, Blum and Buée-Scherrer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

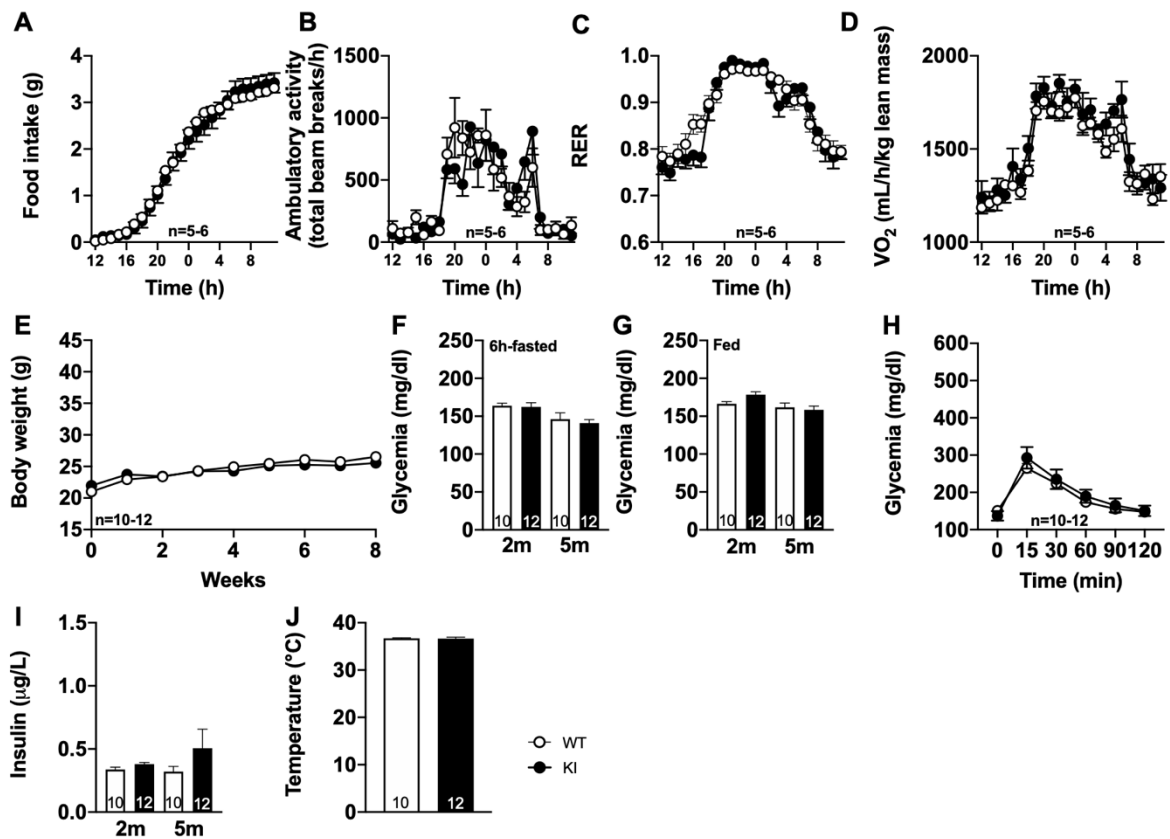


Supplementary Figure 1. Time-line of metabolism investigations in tau KI and littermate WT animals under high-fat diet. Baseline glycemia and plasma insulin measurement were performed after 6 hours of fasting and collected at the age of 7 weeks. Feeding with high-fat diet was started at 8 weeks old. Following metabolic cage measurements (6-7 weeks after HFD onset), metabolic exploration was performed from 8 to 12 weeks following HFD onset. Glycemia and plasma insulin measurements were determined 8 weeks after HFD onset (16 weeks of age). Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) was performed at the 9th week of HFD (17 weeks old). Pyruvate tolerance test (PTT) after an overnight fasting was performed at the 11th week of HFD (19 weeks old). Glycemia measurement after overnight fasting and during the first 4 hours of refeeding was performed at the 12th week of HFD (20 weeks old). At the 13th week of HFD rectal temperature was measured and animals sacrificed.

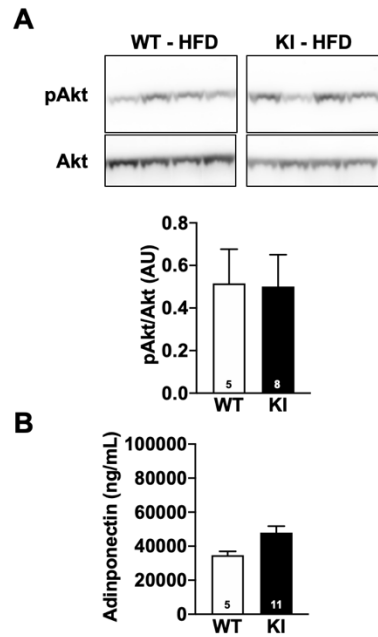


Supplementary Figure 2. Home-made antibodies used for tau immunohistochemistry and Western blots with respective epitopes. Tau 9H12, tauCter 9F6/993 S5 and tauNter htauE1 targeting epitopes are represented. Epitopes are shown with their associated sites corresponding to the longest isoform of tau protein.

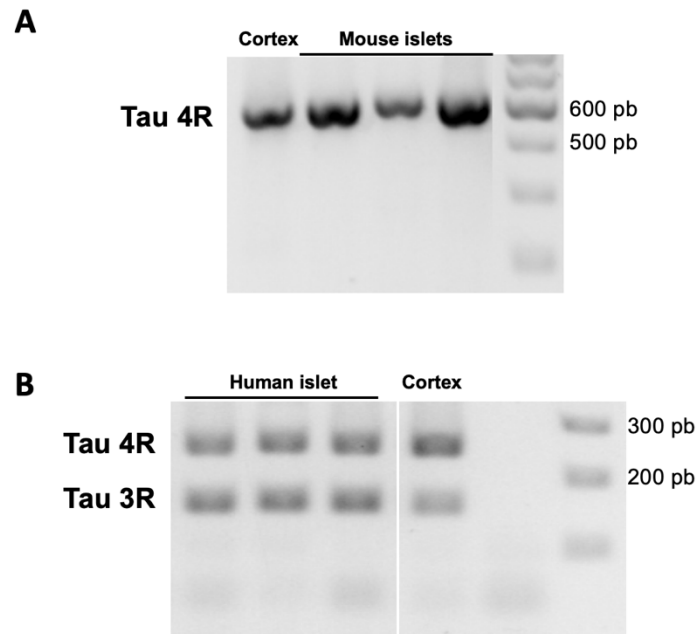
Males (Chow diet)



Supplementary Figure 3. Metabolic phenotyping of tau KI male mice under chow diet. (A-D) Metabolic cage evaluation of tau KI male mice under chow diet. **(A)** 24h-cumulative food intake (g) (NS). **(B)** 24h spontaneous locomotor activity (total beam breaks/h) (NS). **(C)** 24h-respiratory exchange ratio (RER=VCO₂/VO₂) (NS). **(D)** 24h-O₂ consumption (NS). **(E)** Body weight gain of WT and tau KI mice from 2 to 5 months of age (NS). **(F)** Glycemia after 6 hours of fasting at 2 to 5 months of age (NS). **(G)** Glycemia in fed condition (9.a.m) at 2 to 5 months of age (NS). **(H)** Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) at 5 months of age (NS). **(I)** Insulinemia after 6 hours of fasting at 2 to 5 months of age (NS). **(J)** Rectal temperature at 5 months of age (NS). Results are expressed as mean \pm SEM. WT mice are indicated as white circles/bars, tau KI mice as black circles/bars.

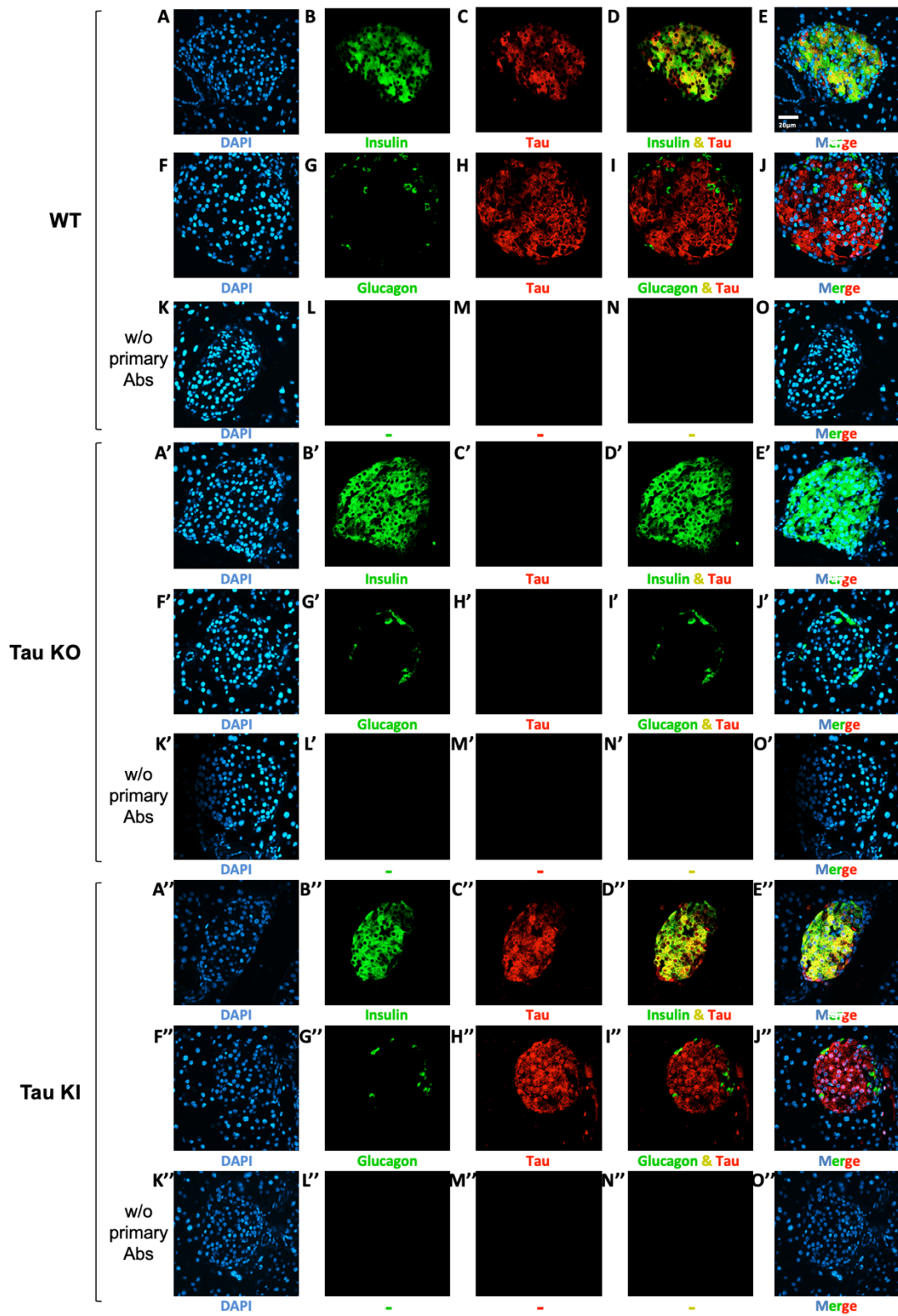


Supplementary Figure 4. (A) pAkt and Akt protein expression in the liver of WT and KI mice under HFD (NS Student's t-test). Western blots are representative. **(B)** Adiponectin dosage in the plasma of WT and KI mice under. WT and KI are indicated as open bars and black respectively. Mice were 5 months old.



Supplementary Figure 5. PCR analysis of mouse and human tau exon 10 splicing in mouse and human pancreatic islets. (A) Mouse analysis in pancreatic islets (n=3) vs. cerebral cortex (n=1). Mice were 5 months old. (B) Human analysis in pancreatic islets (n=3) vs. cerebral cortex (n=1).

Tau 9H12

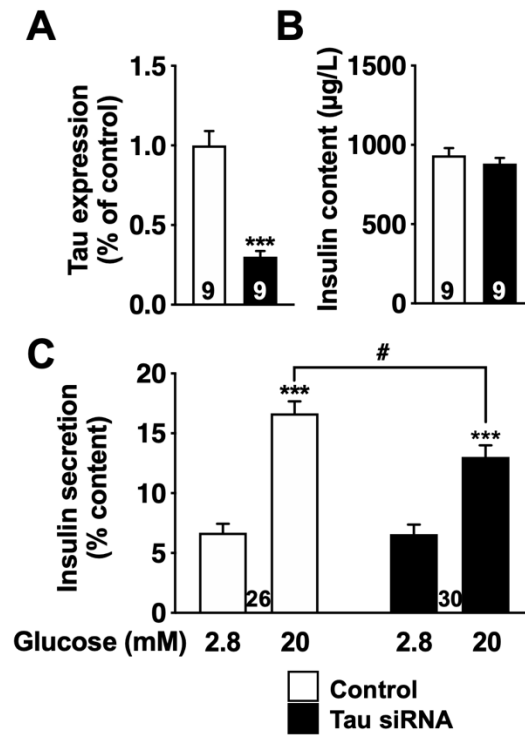


Supplementary Figure 6. Tau expression (tau 9H12 antibody) in mouse islets from WT, tau KO and tau KI mice and colocalization with insulin and glucagon.

Tau WT mice. (A-E) Double immunofluorescence staining for **insulin** (green) and tau (red) in pancreatic islets from adult **WT** mice. Blue: DAPI nuclear counterstaining. **(F-J)** Double immunofluorescence staining for **glucagon** (green) and tau (red) in pancreatic islets from adult **WT** mice. Blue: DAPI nuclear counterstaining. **(K-O)** Absence of staining without primary antibodies. Only secondary antibodies and DAPI nuclear counterstaining (blue) were used.

Tau KO mice (A'-E') Double immunofluorescence staining for **insulin** (green) and tau (red) in pancreatic islets from adult tau **KO** mice. Blue: DAPI nuclear counterstaining. **(F'-J')** Double immunofluorescence staining for **glucagon** (green) and tau (red) in pancreatic islet from adult tau **KO** mice. Blue: DAPI nuclear counterstaining. **(K'-O')** Absence of staining without primary antibodies. Only secondary antibodies and DAPI nuclear counterstaining (blue) were used.

Tau KI mice (A''-E'') Double immunofluorescence staining for **insulin** (green) and tau (red) in pancreatic islets from adult **KI** mice. Blue: DAPI nuclear counterstaining. **(F''-J'')** Double immunofluorescence staining for **glucagon** (green) and tau (red) in pancreatic islet from adult tau **KI** mice. Blue: DAPI nuclear counterstaining. **(K''-O'')** Absence of staining without primary antibodies. Only secondary antibodies and DAPI nuclear counterstaining (blue) were used. Mice were 5 month-old. Scale: 20 μ m. These observations were reproduced in at least 3 independent experiments and samples.



Supplementary Figure 7. Effect of tau knock-down on insulin secretion at glucose stimulated insulin secretion (GSIS) in β pancreatic mouse line Min6. (A) Tau mRNA expression level in control and tau siRNA conditions (*) $p < .0001$, Student's t-test). (B) Min6 cells insulin content at GSIS (NS, Student's t-test). (C) Effect of tau knock-down on insulin release by Min6 cells in low and high glucose conditions at GSIS (Two-Way ANOVA, $F(1,108)=4.39$, $p < 0.05$ test; Tukey's post-hoc test ***) $p < 0.0001$ vs 2.8mM; # $p < 0.05$).**