



**HAL**  
open science

# Implication de la tyrosine kinase Pyk2 dans la synaptotoxicité associée à la maladie d'Alzheimer : une protéine à l'interface des pathologies amyloïde et Tau

Quentin Rodriguez

► **To cite this version:**

Quentin Rodriguez. Implication de la tyrosine kinase Pyk2 dans la synaptotoxicité associée à la maladie d'Alzheimer : une protéine à l'interface des pathologies amyloïde et Tau. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV109 . tel-04625331

**HAL Id: tel-04625331**

**<https://theses.hal.science/tel-04625331v1>**

Submitted on 26 Jun 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

**Implication de la tyrosine kinase Pyk2 dans la synaptotoxicité associée à la maladie d'Alzheimer : une protéine à l'interface des pathologies amyloïde et Tau**

**Involvement of the tyrosine kinase Pyk2 in synaptotoxicity of Alzheimer's disease: a protein at the interface of amyloid and Tau pathologies**

Présentée par :

**Quentin RODRIGUEZ**

Direction de thèse :

**Alain BUISSON**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Rapporteurs :

**Olivier NICOLE**

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Aquitaine

**Morvane COLIN**

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université de Lille

Thèse soutenue publiquement le **18 décembre 2023**, devant le jury composé de :

**Alain BUISSON**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

**Olivier NICOLE**

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Aquitaine

Rapporteur

**Morvane COLIN**

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université de Lille

Rapporteuse

**Catherine GHEZZI**

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

Invités :

**Jean-Antoine GIRAULT**

DIRECTEUR DE RECHERCHE EMERITE, Institut du Fer à Moulin

**Anne FOUREST-LIEUVIN**

DOCTEURE EN SCIENCES HDR, CEA









# Remerciements

---

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : les Docteurs **Olivier Nicole** et **Morvan Colin** en qualité de rapporteurs, ainsi que les Docteurs **Jean-Antoine Girault** et **Anne Fourest-Lieuvain**, et la Professeure **Catherine Ghezzi** en tant qu'examineurs. Je remercie également les Docteurs **Benoît Delatour** et **Olivier Destaing** pour leur investissement et leurs conseils lors de mes comités de suivi individuel.

J'aimerai tout particulièrement remercier mon directeur de thèse, **Alain Buisson**, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci pour ta confiance au cours de ces 3 années. Tu m'as permis d'évoluer professionnellement, de prendre confiance en moi et mes résultats même si ça n'a pas toujours été simple. Merci de m'avoir encouragé à devenir indépendant. Je sais aujourd'hui que je serai capable de gérer mon propre projet, en toute autonomie. Je tiens également à te remercier de m'avoir soutenu dans les différentes hypothèses de travail que j'ai voulu tester, ainsi que pour tous tes conseils, professionnels ou personnels, au cours de cette thèse.

Je voudrai ensuite remercier tous les membres de mon équipe. J'ai eu la chance d'être dans une équipe bienveillante où règne la bonne humeur. C'était un vrai plaisir de faire partie de cette équipe. De manière plus individuelle, je remercie les deux mamans de l'équipe, **Eve Borel** et **Sylvie Boisseau**. Merci à vous pour votre gentillesse, pour toutes les discussions et fous rires que l'on a pu avoir. Vous m'avez toutes les deux formé lors de mon arrivée dans l'équipe et vous avez toujours été disponibles lorsque j'avais besoin d'aide. Merci **Eve** de m'avoir pris sous ton aile dès le début de ma thèse. Merci d'avoir été là, de m'avoir conseillé dans les moments un peu plus compliqués. Je tiens à souligner tout particulièrement ton investissement et celui de **Sylvie** durant l'écriture de ce manuscrit, notamment pour avoir réalisé les dernières expériences dont j'avais besoin. Je vous en ai fait baver mais promis, je vous payerai une tournée (ou deux) !

Je remercie également leurs voisines de bureau, **Muriel Jacquier-Sarlin** et **Mireille Albrieux**. J'ai beaucoup appris grâce à vous, vous êtes toutes les deux un puits de connaissances ! Je vous remercie pour vos conseils sur mes expériences, pour votre soutien

et pour m'avoir motivé durant cette thèse. Je vous remercie également pour votre gentillesse. Merci **Muriel** pour ta joie de vivre et ton franc parlé, tu nous auras bien fait rigoler. **Mireille**, je tiens à te remercier pour ton importante contribution à la relecture de ce manuscrit. Merci également pour la confiance que tu m'as accordée lorsque tu m'as proposé un post-doctorat. J'ai hâte de commencer cette nouvelle aventure avec toi !

Je remercie également les autres membres de mon équipe, **Fabien Lanté, Guillaume Audic, Sacnicite Ramirez Rios, Yves Goldberg, José Martinez Hernandez, Marie-Jo Moutin, Laetitia Peris, Jean-Marc Soleilhac** pour leur gentillesse, pour les conseils et l'aide qu'ils ont pu m'apporter, et pour avoir participé à la bonne ambiance de cette équipe. Je remercie également notre gestionnaire, **Sylvain Andrieu**, pour avoir géré tout le côté administratif. Merci également pour ta gentillesse et ton efficacité. Je souhaiterai également remercier **Béatrice Blot**, qui n'est pas dans notre équipe mais au vu de tous les plasmides que tu as construits pour moi, je pense que ta place dans ces remerciements est ici. Au-delà du professionnel, je te remercie pour ton écoute et tes conseils tout au long de cette thèse.

Je voudrai ensuite remercier mes collègues et amis doctorants : **Floriane, Maxime et Apolline**. Je sais bien que vous vous attendez à un long discours mais je dirai tout simplement que je n'y serai jamais arrivé sans vous. Cette expérience de thèse a été incroyable grâce à vous. Un grand merci pour votre soutien, surtout au cours de ces dernières semaines d'écriture qui ont été particulièrement difficiles. Merci pour tout, les sorties bar, les raclettes, les petits week-ends à la découverte de vos bourgades respectives, et j'en passe. Mais surtout merci tous les bons moments passés ensemble, merci d'être vous (j'espère que vous avez lâché une petite larme).

I would like to thank my foreign friends in the lab: **Karina, Dharshini, Chadni and Aditi**. You have made this thesis an unforgettable experience. Thank you for your support in the lab, for all the laughs and obviously for teaching me to speak English. I've spent three exceptional years with you and I hope it will continue. Thank you for all the good times we have spent together, all the parties and bars, all hikes even though we almost died in the forest because of Dharshini. Thank you for being there and for everything. I won't forget you, I promise! I would also like to thank our former interns, **Jara and Chloé**, we had a great time all together.

Je souhaiterai également remercier **Tiago Mendes** et **Jean-Antoine Girault** pour les souris Pyk2 KO et les plasmides qu'ils nous ont fourni. Merci **Tiago** pour tes précieux conseils. Je remercie aussi **Isabelle Arnal** et son équipe pour nous avoir fourni la protéine Tau purifiée.

Je souhaiterai également remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ce projet. Merci aux zootechniciens de s'occuper de nos souris, merci à la plateforme d'imagerie PIC-GIN, merci à **Laure** à la laverie et merci aux membres de l'accueil, **Dominique**, **Nicolas**, et **Georges** avant eux, pour leur sympathie. Je remercie également tous les membres de l'Institut avec qui j'ai pu partager de bons moments.

Pour finir, je souhaite remercier mes amis en dehors du labo mais aussi ma famille. Malgré la distance, vous avez toujours été là pour moi. Je tiens à remercier particulièrement mes parents qui ont été d'un soutien indéfectible tout au long de ma vie, quelques soient mes choix universitaires et professionnels. Merci d'être les parents que vous êtes, je ne pouvais pas rêver mieux.



# Table des matières

---

<b>Abréviations</b> .....	5
<b>Introduction</b> .....	7
I. La maladie d'Alzheimer .....	7
A. Généralités.....	7
1) Historique.....	7
2) Statistiques.....	7
B. Aspects cliniques .....	8
1) Symptômes .....	8
2) Traitement et diagnostic.....	9
C. Signes précoces de la maladie .....	11
D. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer .....	13
1) Evolution neuropathologique .....	13
2) Pathologie amyloïde .....	15
a. Production du peptide $\beta$ -amyloïde .....	15
b. Agrégation de l'A $\beta$ : du monomère aux plaques amyloïdes .....	18
c. Rôle neurophysiologique de l'A $\beta$ : une question de concentration ?.....	20
d. Synaptotoxicité des oligomères d'A $\beta$ .....	21
3) Tau dans la maladie d'Alzheimer .....	28
a. Structure de la protéine Tau .....	28
b. Rôle physiologique de Tau .....	31
c. Modifications post-traductionnelles.....	36
d. Mécanismes d'agrégation de la protéine Tau.....	38
e. Neurotoxicité de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer : une coopération entre les protéines A $\beta$ et Tau .....	42

E.	Formes familiales de la maladie d'Alzheimer et facteurs de risques .....	49
1)	Formes familiales .....	49
a.	Mutations des gènes <i>APP</i> , <i>PSEN1</i> et <i>PSEN2</i> .....	49
b.	Modèles murins.....	50
2)	Formes sporadiques.....	53
a.	Facteurs de risques environnementaux.....	53
b.	Facteurs de risques génétiques.....	54
II.	La tyrosine kinase Pyk2 .....	56
A.	Origine et structure .....	56
1)	Famille FAK (focal adhesion kinase).....	56
2)	Structure .....	57
a.	Domaines de Pyk2 .....	57
b.	Isoformes.....	59
B.	Expression et localisation cellulaire.....	61
C.	Régulation de l'activité de Pyk2 .....	62
1)	Mécanismes d'activation .....	62
2)	Mécanismes de régulation de l'activation de Pyk2 .....	65
D.	Pyk2 dans les cellules non-neuronales.....	66
1)	Fonction cellulaire.....	67
2)	Rôle physiopathologique .....	68
E.	Pyk2 dans le système nerveux central .....	69
1)	Activation spécifique de Pyk2 dans les neurones.....	69
2)	Rôle physiologique.....	70
a.	Formation et maintenance des épines dendritiques et des neurites.....	70
b.	Régulation des canaux ioniques.....	72
c.	Plasticité synaptique .....	73

d.	Mémoire et apprentissage .....	75
e.	Pyk2 dans les cellules gliales .....	75
3)	Implication de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer .....	76
<b>Objectifs</b>	.....	<b>83</b>
<b>Matériel et Méthodes</b>	.....	<b>85</b>
I.	Animaux.....	85
II.	Culture cellulaire et transfection .....	86
A.	Culture primaire de neurones corticaux .....	86
B.	Plasmides .....	86
C.	Transfection neuronale .....	87
D.	Imagerie confocale sur neurones vivants.....	88
1)	Analyse de la densité synaptique .....	88
2)	Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) .....	89
III.	Analyses biochimiques .....	89
A.	Production et purification d'oligomères d'A $\beta$ -poly-histidine.....	89
B.	Fractionnement cellulaire.....	90
C.	Western Blot.....	91
D.	Co-immunoprécipitation .....	91
IV.	Etude <i>in vitro</i> .....	92
A.	Purification de Tau 1N4R.....	92
B.	Production et purification de Pyk2.....	92
C.	Essai kinase .....	93
V.	Electrophysiologie .....	93
A.	Préparation des tranches d'hippocampes.....	93
B.	Préparation d'oligomères $\beta$ -amyloïdes humains .....	94
C.	Enregistrement patch-clamp cellule entière .....	94

D. Enregistrements extracellulaires .....	95
VI. Analyse statistique.....	96
<b>Résultats</b> .....	97
I. Implication de Pyk2 dans la synaptotoxicité induite par les A $\beta$ o .....	97
A. Les A $\beta$ o induisent l'activation de Pyk2 spécifiquement au niveau post-synaptique	97
B. Pyk2 médie les perturbations de la neurotransmission induites par les A $\beta$ o dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer .....	99
C. La surexpression de Pyk2 entraine une diminution de la densité des épines dendritiques via son domaine PR1 .....	105
II. Pyk2 : une tyrosine kinase de Tau impliquée dans sa localisation synaptique.....	114
A. Pyk2 interagit avec Tau et la phosphoryle sur sa tyrosine 18 .....	114
B. Pyk2 induit la phosphorylation de Tau dans les épines dendritiques et participe à sa localisation synaptique .....	118
<b>Discussion</b> .....	123
I. Rôle de Pyk2 dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer.....	123
II. Impact de Pyk2 sur la densité synaptique.....	125
III. Influence de Pyk2 sur la protéine Tau .....	127
IV. Conclusion .....	131
<b>Annexes</b> .....	133
<b>Références</b> .....	139

## Abréviations

---

**A $\beta$**  : peptide  $\beta$ -amyloïde

**A $\beta$ o** : oligomères d'A $\beta$

**aCSF** : artificial cerebrospinal fluid

**AMPA** :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

**APP** : amyloid precursor protein

**ARNm** : ARN messenger

**CaM** : calmoduline

**CaMKII** : Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II

**Cdk5** : cyclin-dependent kinase-5

**CK1** : casein kinase 1

**DIV** : days *in vitro*

**DNFs** : dégénérescences neurofibrillaires

**FAK** : focal adhesion kinase

**FAT** : focal adhesion targeting

**FERM** : 4.1/ezrin/radixin/moesin

**FRAP** : Fluorescence recovery after photobleaching

**GSK-3 $\beta$**  : glycogène synthase kinase 3 $\beta$

**IRMf** : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

**KFL** : kinase-FAT linker

**KO** : knock-out

**LCR** : liquide céphalo-rachidien

**LTD** : long term depression

**LTP** : long term potentiation

**MAPKs** : mitogen-activated protein kinases

**MAPT** : microtubule-associated protein tau

**MCI** : mild cognitive impairment

**MTBD** : microtubule binding domain

**NMDA** : N-methyl-D-aspartate

**PHFs** : paired helical filaments

**PKA et PKC** : protéine kinase A et C

**PP** : protéine phosphatase

**PR** : riche en proline

**Prp<sup>c</sup>** : protéine prion cellulaire

**PS1 et 2** : préséniline 1 et 2

**PSD** : postsynaptic density

**PTM** : post-translational modifications

**Pyk2** : proline-rich tyrosine kinase 2

**ROS** : reactive oxygen species

**Ser ou S** : sérine

**SFK** : Src-family kinase

**SH2 et 3** : Src homology 2 et 3

**shRNA** : short hairpin RNA

**siRNA** : small interfering RNA

**STEP** : striatal-enriched protein tyrosine phosphatase

**TEP** : tomographie par émission de positrons

**Thr ou T** : thréonine

**Tyr ou Y** : tyrosine

**WT** : wild-type



# Introduction

---

## I. La maladie d'Alzheimer

### A. Généralités

#### 1) Historique

Cette histoire commence le 25 novembre 1901, lorsque le Docteur allemand Aloïs Alzheimer, psychiatre et neurologue à l'Asile municipal pour les maladies mentales et les épileptiques de Francfort-sur-le-Main, reçoit Auguste Deter, une patiente âgée de 51 ans. Cette dernière présente d'importants troubles cognitifs, notamment une altération de sa compréhension et de ses capacités mnésiques, une aphasie, une désorientation, un comportement imprévisible, de la paranoïa, des hallucinations auditives et une déficience psychosociale prononcée (Maurer, Volk, et Gerbaldo 1997). Il remarquera par exemple qu'elle est incapable d'identifier les aliments de son repas et appellera « épinards » le porc qu'elle consomme.

Suite au décès d'Auguste Deter en 1906, le Docteur Alzheimer réalise l'autopsie de son cerveau et c'est en 1907 qu'il décrira, dans une publication (Alzheimer et al., 1995 - traduction anglaise de l'article original du Docteur Aloïs Alzheimer), les altérations anatomiques observées dans son cerveau : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs). Il nommera cette atteinte cérébrale « maladie particulière du cortex cérébral » et il faudra attendre 1910 pour que cette pathologie soit appelée « maladie d'Alzheimer » par le psychiatre Emil Kraepelin.

#### 2) Statistiques

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative et la forme de démence la plus fréquente. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, on compte plus de 55 millions de personnes atteintes de démence dans le monde, dont 60 à 70% seraient des cas de maladie d'Alzheimer. Le nombre de malades ne cesse d'augmenter et devrait presque doubler tous les 20 ans, atteignant ainsi plus de 80 millions de cas en 2040.

En 2019, on compte environ 1,2 million de personnes touchées par la maladie d'Alzheimer en France. Le nombre de nouveaux cas chaque année est estimé à plus de 225 000 personnes. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement. Sa prévalence augmente donc fortement avec l'âge et est estimée à environ 3% des français de plus de 65 ans et atteint plus de 20% des personnes de plus de 80 ans (Dementia in Europe Yearbook 2019 – Estimating the prevalence of dementia in Europe). Cependant, on estime qu'environ 30 000 patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont moins de 60 ans.

Si le nombre de malades est estimé à 1,2 million en France, le nombre de personnes impactées par cette maladie est d'environ 3 millions (malades et proches aidants). Ainsi, environ 10 milliards d'euros sont consacrés à la prise en charge médicale et médico-sociale de la maladie (chiffre de l'Institut Pasteur). La recherche sur la maladie d'Alzheimer constitue donc un enjeu médical, économique et social majeur.

## B. Aspects cliniques

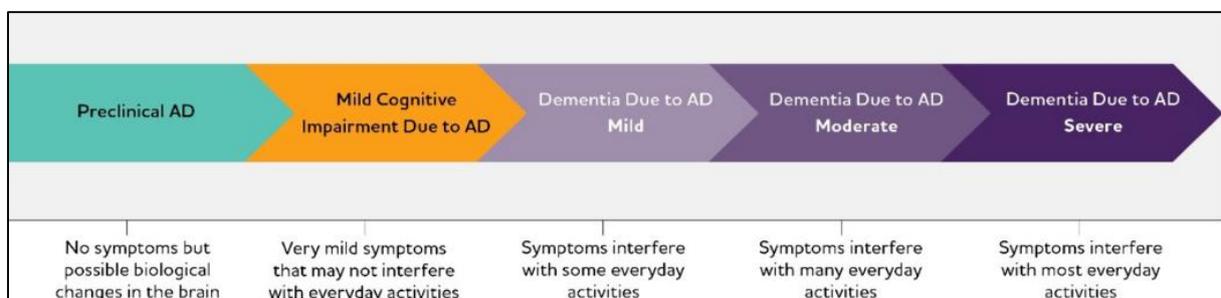
### 1) Symptômes

La maladie d'Alzheimer se caractérise par des pertes de mémoire. Il s'agit d'une maladie évolutive qui commence généralement par un trouble mnésique isolé, progressif et inconnu du patient. Elle touche tout d'abord la mémoire à court terme puis, avec la progression de la maladie, elle affecte les régions du cerveau impliquées dans la mémoire à long terme. L'évolution de la maladie va également conduire à l'apparition et l'aggravation progressive d'un panel de troubles cognitifs : des troubles du langage ; des apraxies qui correspondent à l'atteinte des gestes élaborés tels que boutonner sa chemise ; des troubles des fonctions exécutives, indispensables pour réaliser des tâches complexes ou nouvelles, pour planifier ou raisonner ; des troubles de la reconnaissance d'objets ou de personnes ; des troubles de l'humeur et du comportement tels que l'agressivité, la dépression ou encore l'apathie (Jahn, 2013 ; Lesourd et al., 2013 ; Mograbi & Morris, 2014 ; Whitwell et al., 2015). Dans les stades les plus avancés, les patients présentent une perte d'autonomie totale que l'on appelle démence.

Bien que l'apparition de ces symptômes soit graduelle, elle peut être très variable d'un patient à l'autre. On distingue trois stades de la maladie en fonction de l'apparition et

l'importance des symptômes, et de leur impact sur la vie quotidienne des patients (**Figure 1**) (Clifford R. Jack et al. 2012; R. Sperling, Mormino, et Johnson 2014) :

- Le stade asymptomatique : il peut durer plus d'une décennie et ne présente aucun symptôme clinique détectable. En revanche, certains patients peuvent présenter des biomarqueurs positifs notamment une diminution du peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 ( $A\beta_{42}$ ) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) du fait de son accumulation dans le cerveau, ou un signal amyloïde élevé en tomographie par émission de positrons (TEP).
- Le stade prodromal aussi appelé Mild Cognitive Impairment ou MCI : il dure entre 3 et 5 ans au cours duquel certains troubles cognitifs apparaissent mais sans perte d'autonomie. Les patients présentent de légers déficits de mémoire et des fonctions exécutives parfois associés à une désorientation dans l'espace ou à un manque du mot.
- Le stade de démence : on parle de démence lorsque les troubles cognitifs et du comportement entraînent la perte d'autonomie des malades. Aujourd'hui, on parle de troubles neurocognitifs majeurs. Selon la gravité de l'atteinte des fonctions cognitives et la dépendance croissante des patients, on distingue la démence légère, modérée et sévère.



**Figure 1 : Progression clinique de la maladie d'Alzheimer** (2023 Alzheimer's disease facts and figures 2023). La flèche représente les différents stades de la maladie avec les symptômes biologiques et/ou cliniques associés. On retrouve tout d'abord la stade asymptomatique ou « Preclinical AD (Alzheimer's disease) », puis le stade prodromal ou MCI et enfin les stades de démence légère, modérée et sévère (la longueur des flèches n'est pas représentative de la durée du stade).

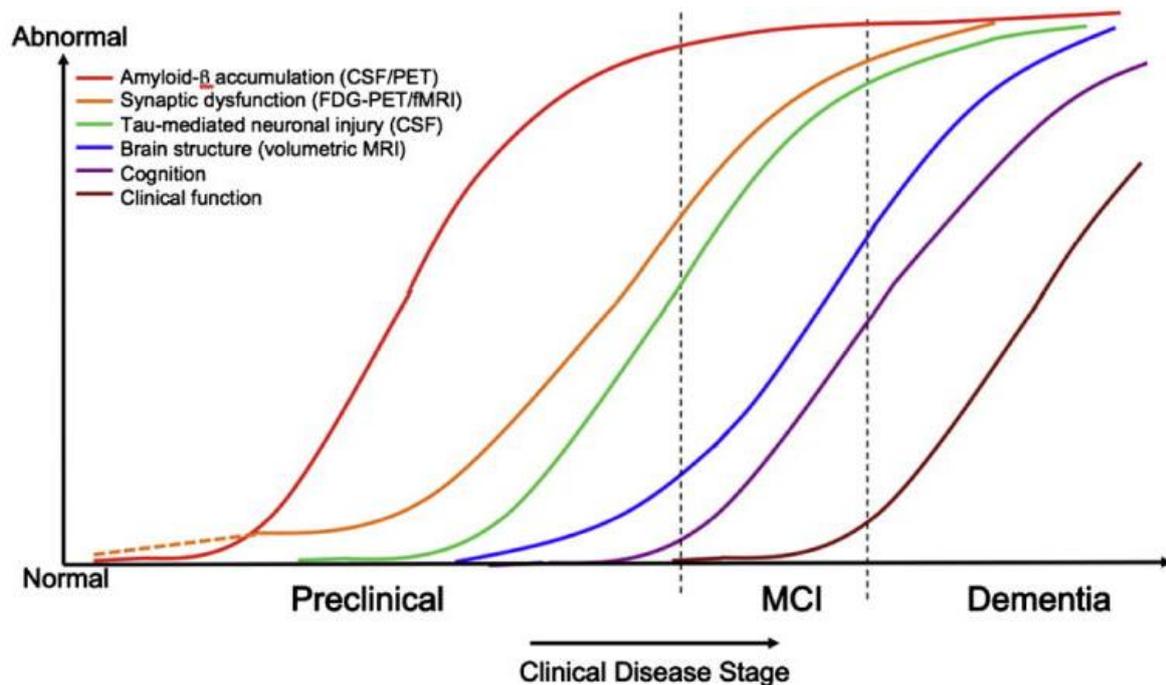
## 2) Traitement et diagnostic

À ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie d'Alzheimer. En revanche, quatre médicaments sont disponibles sur le marché (source Haute Autorité de Santé) : le Donépézil, la Rivastigmine, la Galantamine et la Mémantine qui permettent de ralentir la

progression de la maladie et d'atténuer les symptômes cognitifs (Howard et al. 2015). C'est pourquoi il est important d'établir un diagnostic le plus précocement possible.

A l'heure actuelle, le diagnostic est principalement clinique, les autres méthodes étant onéreuses ou invasives. Parmi les tests mis en œuvre, on retrouve notamment des tests neuropsychologiques qui évaluent les performances cognitives, le test le plus classique étant le MMSE pour Mini-Mental State Examination (Derouesne et al. 1999). À cela s'ajoutent différentes techniques d'imagerie telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet d'évaluer et suivre l'atrophie cérébrale. L'imagerie nucléaire est également utilisée, notamment la TEP-FDG (fluorodéoxyglucose) qui permet d'identifier des altérations du métabolisme du glucose dans certaines régions cérébrales ; ou encore la TEP amyloïde qui permet de mettre en évidence une pathologie amyloïde dans le cerveau des patients. Enfin, une ponction lombaire peut également être réalisée afin de détecter une modification des niveaux d'A $\beta$ <sub>42</sub> ou de protéine Tau (un autre biomarqueur de la maladie qui sera décrit dans la suite du manuscrit) dans le LCR (Olsson et al. 2016). Cette technique est la principale utilisée en France à l'heure actuelle et est généralement réservée aux patients jeunes.

Ces biomarqueurs et les troubles cognitifs évalués évoluent de façon différente (**Figure 2**). L'accumulation d'A $\beta$ <sub>42</sub> dans le cerveau commence de façon précoce pour atteindre un plateau lorsque les premiers troubles cognitifs se déclarent. Les biomarqueurs de dysfonctions synaptiques (TEP-FDG et IRM fonctionnelle) apparaissent après l'accumulation d'A $\beta$ <sub>42</sub> et sont fortement corrélés avec la sévérité des symptômes cliniques (DeKosky & Scheff, 1990; Terry et al., 1991; Mecca et al., 2022). L'accumulation de protéine Tau dans le LCR s'observe plus tard et est corrélée aux DNFs et à la mort neuronale.



**Figure 2 : Modèle hypothétique de la dynamique des biomarqueurs associée aux différents stades de la maladie d'Alzheimer (adaptée de R. A. Sperling et al., 2011).** L'accumulation d'A $\beta$  est montrée par imagerie TEP amyloïde. Les dysfonctions synaptiques sont mises en évidence par TEP-FDG ou imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). La ligne orange en pointillée indique que ces dysfonctions synaptiques peuvent être détectables avant l'accumulation d'A $\beta$  chez les sujets portant l'allèle  $\epsilon 4$  du gène de l'apolipoprotéine E (une protéine dont nous parlerons dans la suite du manuscrit). Les lésions neuronales sont identifiées par la présence de la protéine Tau totale ou phosphorylée dans le LCR. L'atrophie cérébrale est démontrée par IRM structurale. Ces biomarqueurs évoluent d'un niveau normal à anormal (axe des y) en fonction du stade de la maladie (axe x). Les fonctions cognitives et cliniques sont utilisées comme indicateurs pour évaluer les stades MCI et de démence de la maladie.

Malgré cet ensemble d'examen biologiques et neuropsychologiques, il est souvent considéré que le diagnostic formel de la maladie ne peut être réalisé que par l'observation *post-mortem* des lésions cérébrales (plaques amyloïdes et DNFs). Toutefois, selon la Fondation Recherche Alzheimer, il est aujourd'hui possible, grâce aux avancées de la recherche et de la technologie, d'établir un diagnostic non équivoque de la maladie du vivant du patient.

### C. Signes précoces de la maladie

Comme mentionné précédemment, des biomarqueurs de la maladie peuvent être détectés avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. Cependant, l'étude des stades précoces de la maladie est difficilement réalisable du fait de leur caractère asymptomatique.

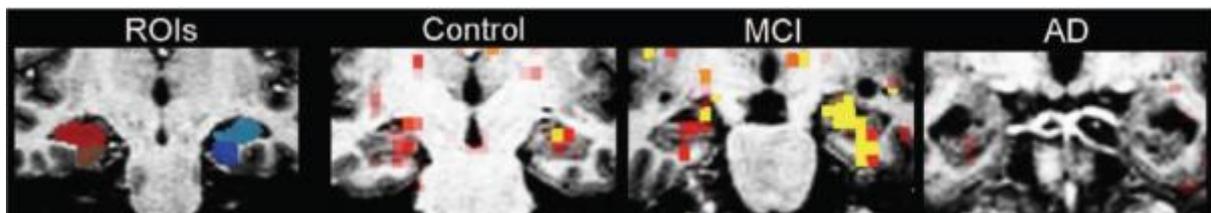
C'est pourquoi, les données actuelles de la littérature proviennent majoritairement d'études longitudinales sur des patients au stade MCI. Il est important de noter que ces patients peuvent évoluer vers le stade de démence (maladie d'Alzheimer ou maladies apparentées) mais peuvent également rester à ce stade MCI tout au long de leur vie sans aggravation des troubles cognitifs. C'est donc l'analyse des patients évoluant vers un stade de démence qui permettra de comprendre davantage les stades précoces de la maladie.

Plusieurs études ont montré des modifications du niveau d'A $\beta$ <sub>42</sub> dans le LCR plusieurs années avant la manifestation des symptômes. Une étude réalisée chez des patients atteints de formes familiales de la maladie d'Alzheimer (les formes familiales et sporadiques de la maladie seront définies dans la suite du manuscrit) a montré une diminution du niveau d'A $\beta$ <sub>42</sub> dans le LCR 25 ans en amont des premiers symptômes. Chez ces patients, les plaques amyloïdes ont pu être détectées par TEP environ 15 ans avant les symptômes, tout comme l'augmentation des concentrations de protéines Tau dans le LCR (Bateman et al. 2012). De plus, une étude longitudinale menée chez des patients MCI évoluant vers le stade de démence de la maladie a montré des modifications du niveau d'A $\beta$ <sub>42</sub> dans le LCR 5 à 10 ans avant les premiers symptômes (Buchhave et al. 2012). Ces données suggèrent donc un rôle précoce du peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) dans la mise en place de la maladie d'Alzheimer.

D'autres altérations ont été identifiées au cours des stades précoces de la maladie, notamment une diminution du nombre de synapses chez les patients MCI. En utilisant la microscopie électronique à transmission sur des prélèvements de tissus en *post-mortem*, Scheff et al., 2007 ont montré une perte synaptique de 18% par rapport au groupe contrôle dans la région CA1 de l'hippocampe. Cette altération de la densité synaptique n'est pas uniquement localisée au niveau de cette région puisqu'elle a également été identifiée au niveau du gyrus cingulaire postérieur, une région corticale étroitement liée à l'hippocampe et au cortex entorhinal, deux régions lésées au cours des premiers stades de la maladie. Les patients MCI présentaient un nombre de synapses compris entre les sujets contrôles et Alzheimer associé à une diminution significative de marqueurs pré- (synapsine-1 et synaptophysine) et post-synaptiques (PSD95 et SAP-97) (Stephen W. Scheff et al. 2015).

Bien que les stades avancés de la maladie d'Alzheimer soient caractérisés par une hypoactivité cérébrale visible en imagerie par IRMf, les stades précoces de la maladie semblent paradoxalement marqués par une hyperactivité de l'hippocampe (**Figure 3**) (Dickerson et al., 2005; Celone et al., 2006). Cette hyperactivité, tout d'abord considérée comme un mécanisme compensatoire, a ensuite été directement corrélée aux troubles

cognitifs associés à la pathologie. Une étude menée sur des patients MCI suivis durant au moins 4 ans a montré qu'une hyperactivité de l'hippocampe était associée à un déclin cognitif plus important au cours de l'évolution de la maladie (S. L. Miller et al. 2008). De plus, il a été montré que l'utilisation d'une faible dose d'antiépileptique chez des patients MCI de type amnésique permettait de ramener l'hyperactivité hippocampique observée à un niveau comparable aux sujets sains. Cette diminution était également accompagnée d'une amélioration des performances de mémoire (Bakker et al. 2012).

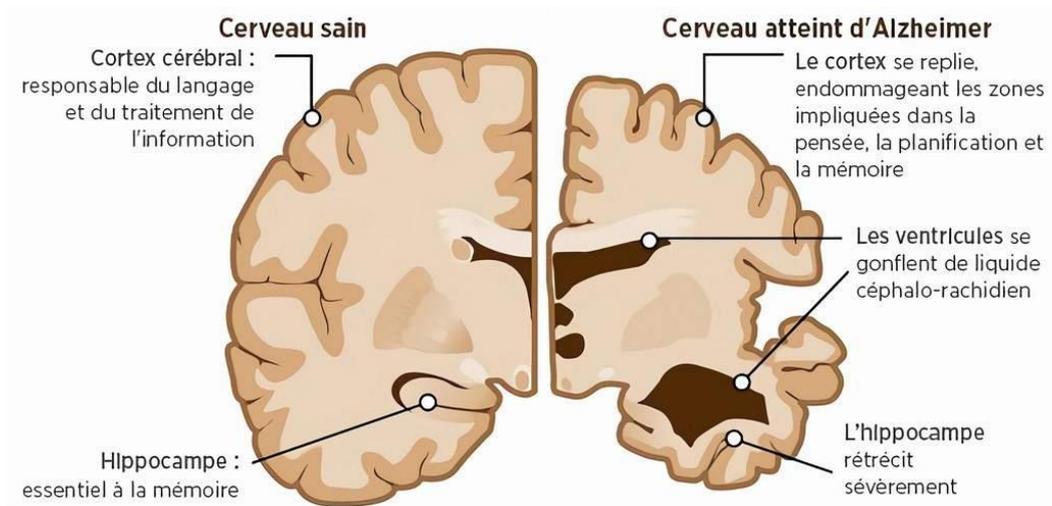


**Figure 3 : Vues coronales représentatives des données IRM fonctionnelle de sujets réalisant une tâche de reconnaissance des visages avec mémorisation des noms (adaptée de Dickerson et al., 2005).** Régions d'intérêt (ROIs) : l'hippocampe (rouge et bleu clair) et le cortex entorhinal (marron et bleu foncé) sont délimités manuellement sur des IRM structurales haute résolution pondérées en T1. Les différents groupes d'étude sont : contrôle, troubles cognitifs légers (MCI), maladie d'Alzheimer (AD). Exemples de cartes d'activation en IRMf d'un sujet de chaque groupe superposées au balayage structural pondéré de ce sujet.

## D. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

### 1) Evolution neuropathologique

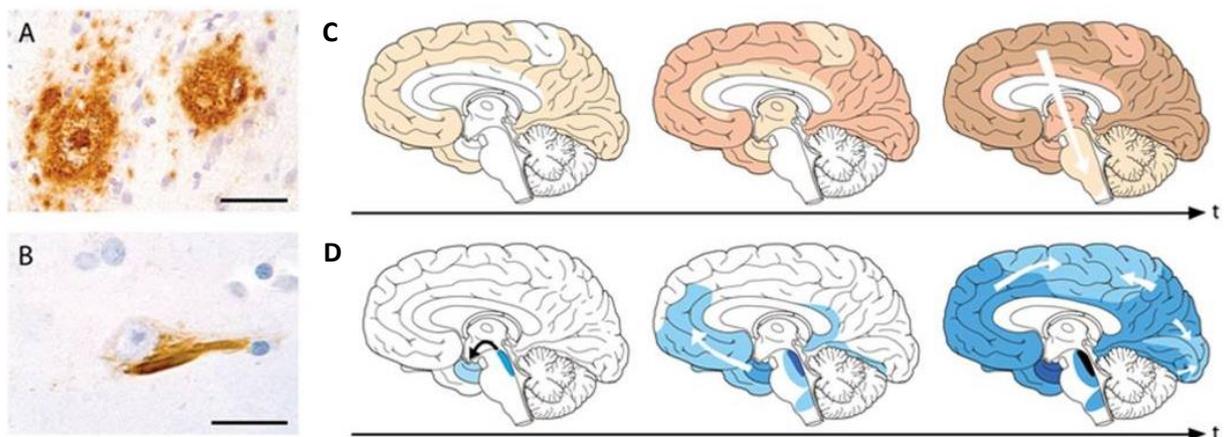
La maladie d'Alzheimer se caractérise par une atrophie cérébrale progressive principalement localisée au niveau du cortex et de l'hippocampe, deux structures impliquées dans les fonctions mnésiques et cognitives. Cette atrophie résulte d'une importante mort neuronale dans ces régions et s'accompagne d'un élargissement des ventricules cérébraux (**Figure 4**). On a ainsi pu observer une diminution du volume cérébral global d'environ 1,9% par an (Sluimer et al. 2008) et, pour l'hippocampe, d'une perte de 2 à 4% par an selon les stades cliniques (C. R. Jack et al. 2000).



**Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'un cerveau sain (à gauche) et d'un cerveau de patient Alzheimer à un stade avancé (adaptée d'Alzheimer's Association).** On observe une importante atrophie de l'hippocampe et un affinement du cortex chez le sujet Alzheimer entraînant les troubles cognitifs associés.

La mort neuronale observée chez les patients est due à l'accumulation, dans le cerveau, de deux protéines conduisant à la formation de deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (**Figure 5**) :

- Les plaques amyloïdes ou plaques séniles composées principalement d'agrégats extracellulaires insolubles de peptides  $\beta$ -amyloïde
- Les dégénérescences neurofibrillaires constituées d'agrégats intraneuronaux de protéines Tau anormalement hyperphosphorylées.



**Figure 5 : Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et leur évolution au cours du temps (adaptée de Jucker & Walker, 2013).** **A.** Dépôts d'A $\beta$  formant des plaques amyloïdes dans le néocortex d'un patient Alzheimer. **B.** Dégénérescence neurofibrillaire dans un neurone du néocortex d'un patient Alzheimer. **C et D.** Respectivement, progression des pathologies

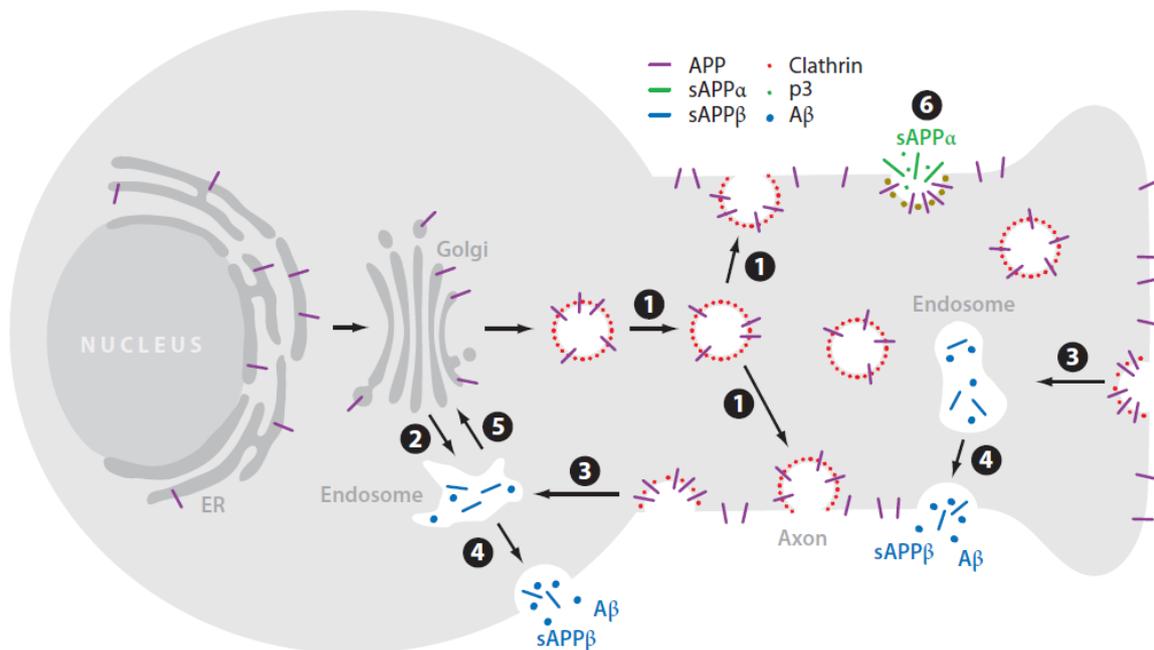
amyloïdes et Tau au cours de la maladie. Trois stades sont représentés. Le gradient de couleur correspond à la sévérité des lésions : plus la couleur est sombre, plus il y a de lésions. Les flèches blanches représentent la propagation des lésions.

Ces lésions neuropathologiques progressent différemment au cours de la maladie. Les travaux de Braak & Braak, 1991 ont permis d'établir l'évolution spatiale de la maladie. Les dépôts amyloïdes apparaissent tout d'abord au niveau des aires basales du cortex. Ils progressent ensuite vers les aires associatives isocorticales, notamment l'hippocampe, puis se répandent dans l'ensemble du cortex. Concernant les DNFs, elles sont davantage corrélées aux symptômes cognitifs. Les premières atteintes sont observées au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe et correspondent à des troubles cognitifs légers (stade MCI). On parle de stades « silencieux ». Ces stades ne sont pas uniquement rencontrés dans la maladie d'Alzheimer mais peuvent également être à l'origine d'autres types de démences. Les DNFs progressent ensuite vers les zones limbiques pour finir par les aires corticales.

## 2) Pathologie amyloïde

### a. Production du peptide $\beta$ -amyloïde

Comme expliqué ci-dessus, les plaques séniles sont majoritairement composées d'agrégats extracellulaires de peptide  $\beta$ -amyloïde (Glennner et Wong 1984). Ce peptide est issu du clivage de l'Amyloïd Precursor Protein (APP), une protéine transmembranaire dont le gène codant est situé sur le chromosome 21 chez l'Homme. Bien que ses fonctions font encore l'objet d'études, l'APP a été impliquée dans différents processus physiologiques, notamment la croissance et le guidage axonale (Sabo et al. 2003; Szodorai et al. 2009; Sosa et al. 2013) ou encore l'adhésion cellulaire (Ghisso et al. 1992; T. Yamazaki, Koo, et Selkoe 1997). Dans les neurones, l'APP est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique puis transite via le réseau Trans-Golgi. Du Golgi, l'APP est soit adressée à la membrane plasmique, notamment au niveau des terminaisons synaptiques par un rapide transport axonal (Koo et al. 1990), ou alors elle peut être directement internalisée dans le compartiment endosomal (**Figure 6**).



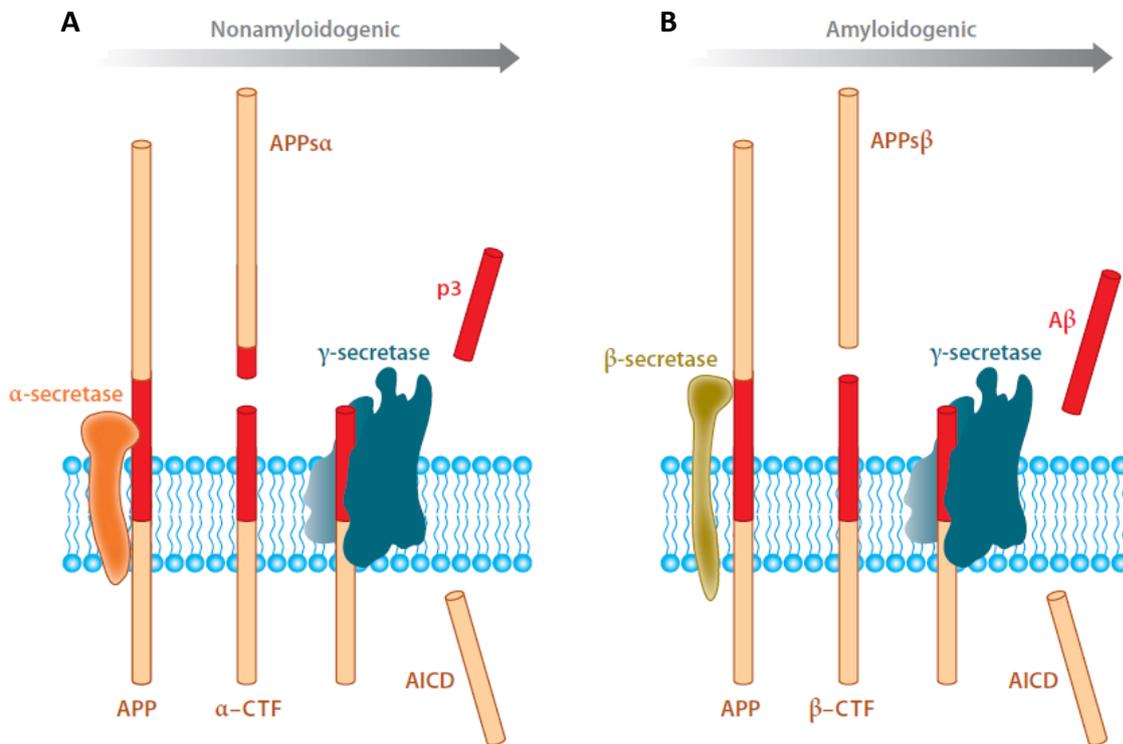
**Figure 6 : Trafic de l'APP dans les neurones (adaptée d'O'Brien & Wong, 2011).** L'APP nouvellement synthétisée (en violet) est transportée depuis le Golgi le long de l'axone (1) ou dans un compartiment endosomal du corps cellulaire (2). Après insertion à la surface cellulaire, une partie de l'APP est clivée par l' $\alpha$ -sécrétase (6) générant le fragment sAPP $\alpha$  qui se diffuse (en vert), et une partie est réinternalisée dans les endosomes (3), où l'A $\beta$  est généré (en bleu). Après protéolyse, l'endosome est recyclé vers la surface cellulaire (4), libérant l'A $\beta$  (en bleu) et le sAPP $\beta$ . Le transport des endosomes vers le Golgi avant le clivage de l'APP peut également avoir lieu par l'intermédiaire de rétromères (5).

L'APP est clivée selon deux voies, l'une appelée non amyloïdogénique et l'autre nommée amyloïdogénique qui conduira à la formation du peptide A $\beta$  (Figure 7).

Au sein de la voie non-amyloïdogénique, l'APP est tout d'abord clivée par l' $\alpha$ -sécrétase, une enzyme faisant partie de la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) dans laquelle on trouve notamment ADAM 9, 10 et 17 (Asai et al. 2003; Jorissen et al. 2010). Le site de clivage de l' $\alpha$ -sécrétase se trouve au sein de la séquence de l'A $\beta$  empêchant ainsi sa production. En effet, des études ont montré que l'augmentation de l'activité d'ADAM 10 via sa surexpression ou l'activation de SIRT1 couplée à RAR $\beta$  (Retinoic Acid Receptor- $\beta$ ), un régulateur de l'expression du gène d'ADAM 10, diminue de manière significative la production d'A $\beta$  et les déficits cognitifs dans un modèle de souris Alzheimer (Postina et al. 2004; H. R. Lee et al. 2014). Suite au clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase, deux fragments vont être générés : le fragment C-terminal C83 ou  $\alpha$ -CTF composé de 83 acides aminés, et le fragment N-terminal APPs $\alpha$  qui sera sécrété dans le milieu extracellulaire. Le fragment  $\alpha$ -CTF est ensuite clivé par le  $\gamma$ -sécrétase et génère deux nouveaux fragments : P3 et le fragment AICD (APP Intracellular

Domain). Cette  $\gamma$  sécrétase est un complexe multi-enzymatique composé de 4 sous-unités protéiques : la préséniline 1 (PS1) ou 2 (PS2), la nicastrine, APH-1 (Anterior Pharynx-Defective 1) et PEN-2 (Preseniline Enhancer 2).

La voie amyloïdogénique se caractérise par le clivage successif de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase puis la  $\gamma$ -sécrétase. Le clivage par la  $\beta$ -sécrétase, également appelée BACE1 ( $\beta$ -site APP Cleaving Enzyme 1) se produit au niveau du compartiment endosomal. En effet, l'environnement acide des endosomes est optimal pour l'activité enzymatique de BACE1 (Rajendran et al. 2006). Ce clivage génère deux fragments : le fragment C-terminal  $\beta$ -CTF ou C99, et le fragment N-terminal APPs $\beta$ . Le fragment  $\beta$ -CTF est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase produisant ainsi le fragment AICD et le peptide A $\beta$  dont la longueur peut varier de 38 à 43 acides aminés selon le site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase (LaFerla, Green, et Oddo 2007).

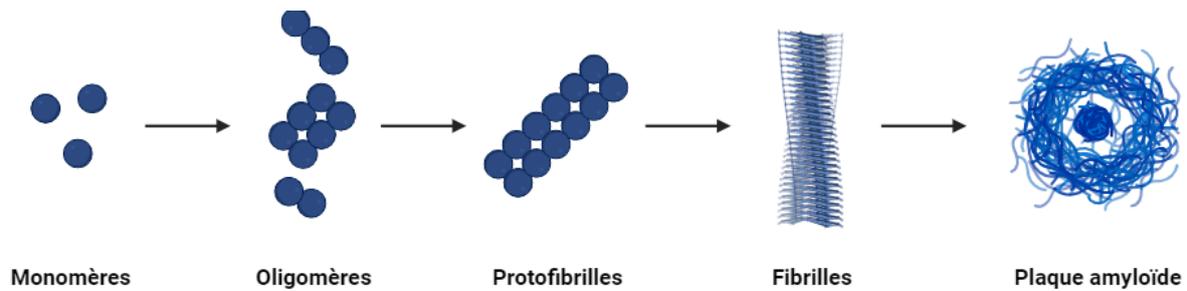


**Figure 7 : Le clivage séquentiel de l'APP s'effectue selon deux voies (adaptée d'O'Brien & Wong, 2011).** La séquence du peptide A $\beta$  commence dans l'ectodomaine et se poursuit dans la région transmembranaire (en rouge). **A.** Voie de clivage non-amyloïdogénique de l'APP impliquant la protéine  $\alpha$ -sécrétase suivie par la  $\gamma$ -sécrétase. **B.** Voie de clivage amyloïdogénique de l'APP impliquant la  $\beta$ -sécrétase aussi appelée BACE1 suivie de la  $\gamma$ -sécrétase. Ces deux voies génèrent des ectodomaines solubles (APPs $\alpha$  et APPs $\beta$ ) ainsi que des fragments C-terminaux intracellulaires identiques (AICD).

Il est important de noter que même si les voies de clivage amyloïdogénique et non amyloïdogénique sont bien connues, la localisation précise de l'APP et des complexes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sécrétases est encore controversée. Par exemple, l'APP a également été observée au niveau des membranes mitochondriales (Mizuguchi, Ikeda, et Kim 1992) et lysosomales (Kinoshita et al. 2003). De même, bien que le peptide A $\beta$  ait été identifié comme le composant majoritaire des plaques amyloïdes extracellulaires, de nombreuses études ont mis en évidence la présence et l'accumulation d'A $\beta$  intracellulaire dans des cultures primaires de neurones traitées avec de l'A $\beta$  humain ou synthétique et dans des modèles de souris Alzheimer (O. Wirths et al. 2001; Tampellini et al. 2011; Ripoli et al. 2014), ainsi que chez des patients (Grundke-Iqbal et al. 1989; Gouras et al. 2000; Gómez-Ramos et Asunción Morán 2007).

#### b. Agrégation de l'A $\beta$ : du monomère aux plaques amyloïdes

En condition physiologique, le clivage de l'APP produit différentes isoformes d'A $\beta$  dont les plus abondantes sont l'A $\beta_{1-40}$  (environ 90%), constitué de 40 acides aminés, et l'A $\beta_{1-42}$  (environ 5 à 10%) chez l'Homme (Mori et al. 1992). Bien que le peptide A $\beta$  soit produit sous forme de monomère, sa forte hydrophobicité l'amène rapidement à s'agréger en complexes multimériques (**Figure 8**). Ainsi, l'A $\beta$  va en premier lieu former des oligomères solubles de faible poids moléculaire (principalement des dimères et trimères). Ces derniers vont ensuite se regrouper pour former des protofibrilles et fibrilles insolubles de haut poids moléculaire (LaFerla, Green, et Oddo 2007). L'isoforme A $\beta_{42}$  possède deux acides aminés hydrophobes supplémentaires (Isoleucine et Alanine) en position C-terminale lui conférant des propriétés d'agrégation plus importante que son homologue A $\beta_{40}$  (D. Burdick et al. 1992; Jarrett, Berger, et Lansbury 1993). Elle est donc plus encline à s'oligomériser et former des fibrilles. C'est l'agrégation de ces dernières qui conduira à la formation des plaques amyloïdes que l'on retrouve dans la maladie d'Alzheimer (Sgourakis et al. 2007). De plus, des études ont montré que cette isoforme A $\beta_{42}$  est davantage présente dans les plaques séniles de cerveaux de patients Alzheimer que les autres formes d'A $\beta$  (D. L. Miller et al. 1993; Iwatsubo et al. 1994; Gravina et al. 1995).



**Figure 8 : Stades d'agrégation de l'Aβ dans la maladie d'Alzheimer (adaptée de LaFerla et al., 2007).** Le peptide β-amyloïde existe sous différents états d'assemblage : monomérique, oligomérique, protofibrillaire et fibrillaire. C'est la capacité de ce peptide à former des fibrilles et d'autres états intermédiaires qui lui confère les caractéristiques physiopathologiques uniques qui définissent la pathologie de la maladie d'Alzheimer. À l'état monomérique, l'Aβ ne semble pas être neurotoxique. En revanche, les espèces oligomériques sont considérées comme impliquées dans la perturbation des processus de plasticité synaptique.

Tandis que l'une des caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer est la présence de plaques amyloïdes dans le cerveau, les formes oligomériques solubles d'Aβ sont aujourd'hui considérées comme étant plus toxiques que les formes fibrillaires insolubles (Lambert et al. 1998; M. Ahmed et al. 2010). En effet, des plaques amyloïdes ont été observées dans le cerveau de sujets âgés ne présentant aucun troubles cognitifs (Dickson et al. 1992). De plus, les plaques séniles ne corrèlent que très faiblement avec la mort neuronale (Benilova, Karran, et De Strooper 2012) et corrèlent moins bien avec les déficits cognitifs que la quantité de formes solubles d'Aβ (McLean et al. 1999; J. Wang et al. 1999). Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence une toxicité des formes oligomériques d'Aβ sur la plasticité synaptique associée à une perturbation de l'apprentissage et de la mémoire (Walsh et al. 2002; Cleary et al. 2005; Lesné et al. 2006). Des travaux sur le primate non-humain ont montré que la micro-injection d'oligomères d'Aβ humains dans le cerveau induit une perte d'épines dendritiques (Beckman et al. 2019). Enfin, un groupe de chercheurs japonais a identifié une nouvelle mutation de l'APP dans une forme familiale de la maladie (Tomiyama et al. 2008). Cette mutation nommée « Osaka » favorise l'oligomérisation de l'Aβ mais ne permet pas la formation de fibrilles et donc de plaques amyloïdes malgré une apparition des troubles cognitifs de manière précoce et sévère (Tomiyama et Shimada 2020). Ce même groupe a généré des souris transgéniques exprimant cette mutation Osaka (Tomiyama et al. 2010). Ils ont montré que cette accumulation d'oligomères d'Aβ entraînait non seulement une altération de la plasticité synaptique et de la mémoire, mais également d'autres caractéristiques de la maladie d'Alzheimer telles que la phosphorylation anormale de la

protéine Tau, l'activation microgliale et astrocytaire ou encore la mort neuronale sans formation de plaque amyloïde.

Ces observations semblent donc indiquer un rôle prépondérant des formes solubles du peptide amyloïde par rapport aux plaques séniles dans la mise en place de la maladie d'Alzheimer. De plus, une hypothèse a été proposée selon laquelle la présence de plaques amyloïdes serait neuroprotectrice en séquestrant les oligomères d'A $\beta$ , atténuant ainsi la toxicité de ce peptide (Reiss et al. 2018).

### c. Rôle neurophysiologique de l'A $\beta$ : une question de concentration ?

Bien que la toxicité de l'A $\beta$  soit impliquée dans la mise en place de la maladie, ce peptide exerce également des rôles physiologiques dans le corps humain, notamment dans le cerveau (Kent, Spiers-Jones, et Durrant 2020). En effet, il a été suggéré que la toxicité de l'A $\beta$  serait en partie dépendante de sa concentration. Si les fortes concentrations d'A $\beta$  dans le cerveau de patients Alzheimer sont de l'ordre du nanomolaire, chez les sujets sains, cette concentration est estimée dans une gamme de concentrations du picomolaire (J. Wang et al. 1999). Grâce à des mesures par microdialyse, ce niveau de concentration basale a également été retrouvé *in vivo*, dans le liquide interstitiel de cerveaux de souris (Cirrito et al. 2003). Comme le suggèrent les travaux de Puzzo et al., 2011, cet A $\beta$  endogène semble particulièrement important dans la mise en place de la plasticité synaptique. En associant des expériences de comportement et de potentialisation à long terme (ou Long Term Potentiation – LTP), un type de plasticité synaptique considéré comme l'un des mécanismes cellulaires majeurs qui sous-tendent l'apprentissage et la mémoire, Puzzo et son équipe ont observé que l'injection dans l'hippocampe d'anticorps dirigés contre l'A $\beta$  endogène ou de siRNA (small interfering RNA) dirigés contre le gène de l'APP murin entraînait une réduction de la LTP et des performances mnésiques des souris. Cependant, l'injection de 200 pM d'A $\beta$ <sub>42</sub> oligomérique humain chez ces souris a permis de restaurer ces effets. Ce même groupe a également montré que l'utilisation de concentrations physio- ou pathologiques d'A $\beta$  humain permettait de moduler positivement ou non la neurotransmission et la mémoire. Ainsi, l'utilisation de 200 pM d'A $\beta$ <sub>42</sub> oligomérique humain conduisait à une augmentation de la LTP ainsi qu'une amélioration de la mémoire de référence et de peur contextuelle, alors que 200 nM d'A $\beta$  oligomérique humain entraînait au contraire une altération de cette LTP (Puzzo et al. 2008). Ces résultats ont été corroborés par d'autres équipes (Garcia-Osta et Alberini 2009;

Morley et al. 2010) dont les travaux de Gulisano et al., 2019 qui ont montré que l'ajout extracellulaire de 200 pM d'A $\beta$ <sub>42</sub> oligomérique humain conduisait à une amélioration de l'activité synaptique de l'hippocampe associée à des performances cognitives accrues. Suite à ce traitement, il a notamment été observé une libération plus importante de neurotransmetteur au niveau présynaptique ainsi qu'une augmentation de la taille de la densité post-synaptique. Ces modifications des mécanismes pré- et post-synaptiques ont entraîné une conversion de la LTP précoce en LTP tardive se traduisant par un basculement des performances mnésiques des souris de court à long terme.

Ces expériences ont mis en évidence un potentiel rôle hormétique de l'A $\beta$  sur la plasticité synaptique et la mémoire. Ainsi, la production physiologique d'A $\beta$  tout au long de la vie pourrait conduire à une accumulation toxique en condition pathologique. En effet, chez l'Homme, les régions cérébrales qui présentent des niveaux élevés d'activité neuronale chez les jeunes adultes sont étroitement corrélées aux régions présentant une forte charge amyloïde chez les sujets présentant une maladie d'Alzheimer plus tard dans leur vie (Buckner et al. 2005).

#### d. Synaptotoxicité des oligomères d'A $\beta$

Nous avons donc vu un rôle physiologique de l'A $\beta$  sur l'activité synaptique. Son accumulation dans le cerveau semble entraîner une hyperactivité neuronale qui, dans des conditions pathologiques, peut conduire à des troubles de la plasticité synaptique et des capacités mnésiques. Nous allons maintenant nous intéresser aux mécanismes sous-jacents à cette hyperactivité induite par les oligomères d'A $\beta$  (A $\beta$ <sub>o</sub>) (**Figure 9**) et les conséquences neurotoxiques observées.

En condition physiologique, il existe une balance entre excitation et inhibition neuronale. L'hyperactivité observée en condition pathologique pourrait ainsi résulter d'une perturbation de cette balance en faveur de l'excitation (Palop et al. 2007). Plusieurs études réalisées dans des modèles de souris Alzheimer suggèrent que les A $\beta$ <sub>o</sub> altèrent cette balance excitation/inhibition en diminuant la transmission inhibitrice GABAergique qui, en retour, induit une activation excessive de la neurotransmission excitatrice glutamatergique (Busche et al. 2008; Yang et al. 2009; Verret et al. 2012). De plus, les travaux de Limon et al., 2012 ont permis de mettre en évidence une perturbation de la neurotransmission GABAergique dans le cerveau humain. Pour cela, ils ont microtransplanté des membranes cellulaires provenant

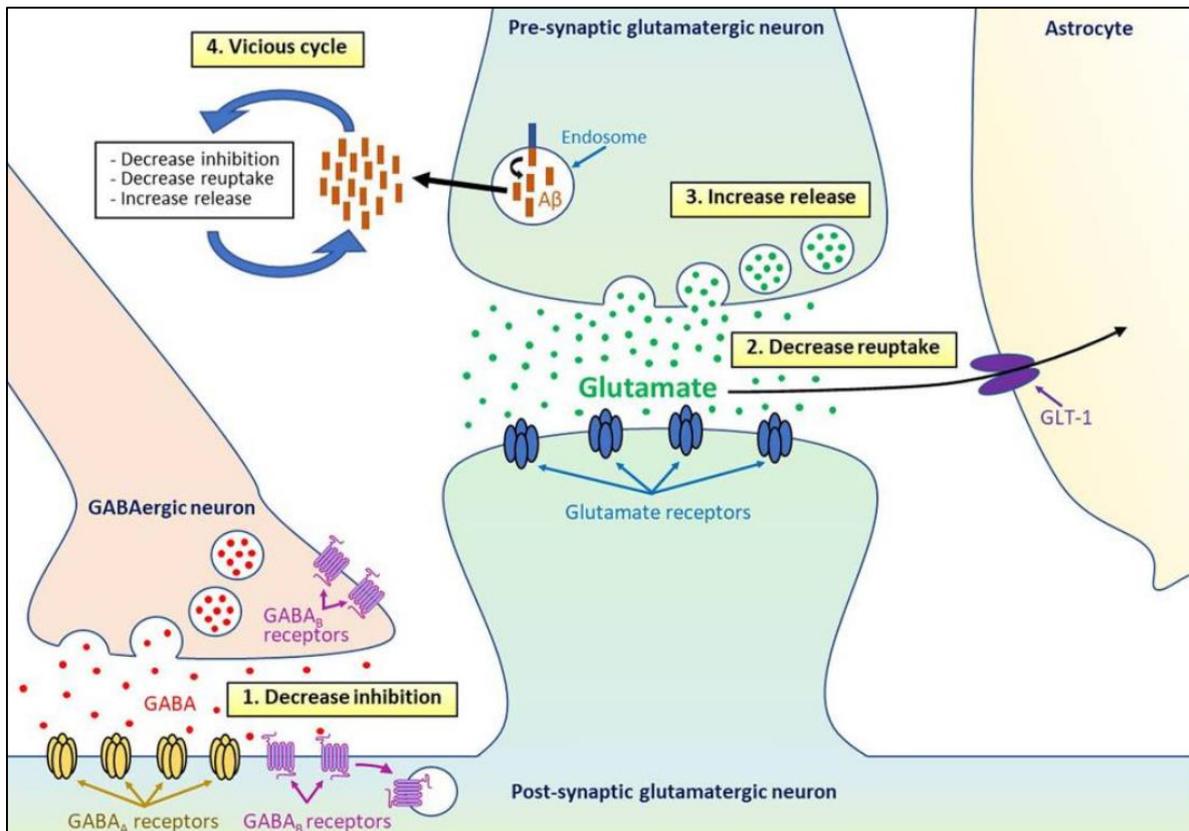
du cortex temporal de sujets sains et de patients Alzheimer dans des ovocytes de xénopes. Ils ont ensuite effectué des enregistrements électrophysiologiques des récepteurs GABA transplantés et ont observé une réduction des courants GABA, une désensibilisation plus élevée et une sensibilité moins importante au GABA chez les sujets Alzheimer. Cette diminution de l'activité synaptique inhibitrice, associée à une activité synaptique excitatrice plus élevée, a également été observée dans des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes humaines (hiPSC pour humain induced Pluripotent Stem Cell) et des organoïdes cérébraux portant des mutations de l'APP ou de la PS1 (Ghatak et al. 2019). Cette activité neuronale excitatrice aberrante déclenchée par l'A $\beta$  dans le cortex et l'hippocampe d'un modèle de souris Alzheimer induit des mécanismes inhibiteurs inadaptés réduisant ainsi la surexcitation neuronale (Palop et al. 2007). Ces mécanismes compensatoires pourraient être impliqués dans la transition d'hyper- à hypoactivité observée dans les modèles de souris Alzheimer ainsi que chez les patients (Celone et al. 2006; R. A. Sperling et al. 2009; Busche et Konnerth 2016).

L'hyperactivité générée par les A $\beta$  pourrait également être expliquée par l'accumulation de glutamate au niveau synaptique. Chez les mammifères, le glutamate est considéré comme le principal neurotransmetteur exciteur (Fagg et Foster 1983). Dans la synapse, sa localisation et sa concentration sont finement régulées par des mécanismes de recapture impliquant des transporteurs au niveau de la membrane neuronale présynaptique et de la membrane astrocytaire environnant la synapse (Danbolt 2001). La perturbation de l'homéostasie glutamatergique par un défaut de recapture du glutamate présent dans la fente synaptique et/ou une augmentation de la libération présynaptique de ce neurotransmetteur peut conduire à des phénomènes d'excitotoxicité. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, une diminution de l'activité de ces transporteurs du glutamate a été observée dans des échantillons de cerveaux de patients Alzheimer (Masliah et al. 1996), ainsi qu'une altération d'une enzyme impliquée dans la recapture du glutamate par les astrocytes (Butterfield et al. 2002; Castegna et al. 2002). Cette altération des transporteurs du glutamate a également été retrouvée dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Mookherjee et al. 2011; Schallier et al. 2011; Hefendehl et al. 2016). Ces défauts de recapture du glutamate ont également été observés dans des cultures astrocytaires d'hippocampes de rat traitées avec des A $\beta$  (Harris et al. 1996; Parpura-Gill, Beitz, et Uemura 1997). Plus récemment, les travaux de Zott et al., 2019 ont mis en évidence que l'hyperactivité induite par les A $\beta$  dans les

neurones de la région CA1 de l'hippocampe était déclenchée par une perturbation de la recapture du glutamate qui, en retour, augmente la transmission glutamatergique excitatrice.

Plusieurs études ont donc montré qu'un défaut de recapture du glutamate pouvait entraîner une hyperactivité neuronale. Néanmoins, l'accumulation de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique peut également résulter d'une libération aberrante du glutamate stocké dans les vésicules pré-synaptiques. En effet, plusieurs études ont montré que l'application d'oligomères d'A $\beta$  sur des neurones d'hippocampes en culture entraînait une libération plus importante de vésicules pré-synaptiques (Abramov et al. 2009; Brito-Moreira et al. 2011; Russell et al. 2012). En particulier, ce dernier groupe de chercheurs propose un rôle de l'A $\beta_{42}$  dans la perturbation de la formation du complexe Synaptophysine/VAMP2 augmentant ainsi la quantité de vésicules amorcées et l'exocytose. Cependant, l'hypothèse d'un effet pré-synaptique des A $\beta$  sur la libération de neurotransmetteurs a été remise en question par différentes études (Shankar et al. 2008; Shaomin Li et al. 2009; Talantova et al. 2013). En utilisant la Paired-Pulse Facilitation (PPF), une méthode d'enregistrement électrophysiologique permettant d'étudier la quantité de neurotransmetteurs libérés par les terminaisons axonales, ces travaux ont montré que l'application exogène d'A $\beta$  sur des tranches d'hippocampes de souris n'entraînait pas de modification de cette PPF et donc ne semblait pas être directement responsable d'une augmentation de la libération de glutamate par l'élément pré-synaptique.

Puisque l'activité neuronale augmente la production et la sécrétion d'A $\beta$  (Cirrito et al. 2005; Dolev et al. 2013; K. Yamamoto et al. 2015), l'hyperactivité induite par ces oligomères d'A $\beta$  via les mécanismes ci-dessus pourrait également entraîner une libération excessive du peptide amyloïde. Cette accumulation d'A $\beta$  conduirait ainsi à l'apparition d'un cercle vicieux amplifiant et perpétuant les effets neurotoxiques des A $\beta$ .



**Figure 9 : Mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant l'hyperactivité neuronale induite par les Aβ (adaptée de Hector & Brouillette, 2020).**

Bien que le rôle exact de l'Aβ oligomérique dans l'accumulation de glutamate dans la fente synaptique fasse toujours l'objet de débats, les conséquences de cette accumulation semblent, elles, bien établies. Comme mentionné plus haut, la concentration extracellulaire de glutamate est finement régulée. Son accumulation anormale entraîne une activation excessive des récepteurs glutamatergiques conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium à l'origine de processus excitotoxiques. Parmi ces récepteurs, on trouve notamment les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) et NMDA (N-methyl-D-aspartate), tous deux impliqués dans les mécanismes de plasticité post-synaptique. Celle-ci repose sur la capacité des neurones à moduler leur réponse en modifiant la quantité de récepteurs (recrutement ou internalisation) pouvant être sollicités par les neurotransmetteurs libérés par l'élément pré-synaptique. Cette modulation de la quantité de récepteurs correspond à une modification durable de la synapse : on parle de plasticité à long terme. Ainsi, une stimulation électrique à fréquence élevée induit une potentialisation à long terme de la réponse synaptique (LTP) via un influx massif de calcium, alors qu'une stimulation basse fréquence des neurones induit plutôt une dépression à long terme (ou Long Term Depression – LTD) se traduisant par une faible entrée

calcique (Citri et Malenka 2008). Comme indiqué précédemment, la LTP est considérée comme le substrat moléculaire de la mémoire et l'apprentissage et est associée à une augmentation du nombre de récepteurs à la membrane post-synaptique. Au contraire, la LTD correspond davantage à une diminution de l'activité synaptique et à l'élimination des synapses concernées, et est associée à une réduction du nombre de récepteurs à la membrane synaptique. Ainsi, l'accumulation de glutamate dans la fente synaptique induite par les A $\beta$  pourrait conduire à une modification du nombre de récepteurs à la membrane et donc entraîner une perturbation de l'activité synaptique et de cette plasticité.

Une étude a montré que l'activation prolongée des récepteurs NMDA entraînait l'endocytose et la dégradation lysosomale des récepteurs GABA<sub>B</sub> post-synaptiques ce qui pourrait ainsi participer à l'amplification de l'excitabilité neuronale observée dans la maladie d'Alzheimer (Terunuma et al. 2010). Les récepteurs NMDA extra-synaptiques, composés de sous-unités NR2B, sembleraient également être impliqués dans l'hyperactivité de l'hippocampe induite par les A $\beta$  (Shaomin Li et al. 2011; Varga et al. 2014; Paumier et al. 2022). En effet, l'accumulation de glutamate médiée par l'A $\beta$  oligomérique conduirait à un phénomène de débordement du glutamate dans la fente synaptique. Cela entraînerait l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques et l'activation subséquente de cascades de signalisation pro-apoptotiques. D'autres études confirment également l'implication de ces récepteurs extra-synaptiques dans les effets induits par les A $\beta$  (Kervern et al., 2012; pour revue voir Tu et al., 2014 et Zhang et al., 2016). De plus, cette activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques serait responsable d'un métabolisme préférentiel de l'APP vers la voie amyloïdogénique, favorisant ainsi la production d'A $\beta$  (Bordji et al. 2010). Cela participerait donc au cercle vicieux de l'hyperactivité dont nous avons précédemment discuté.

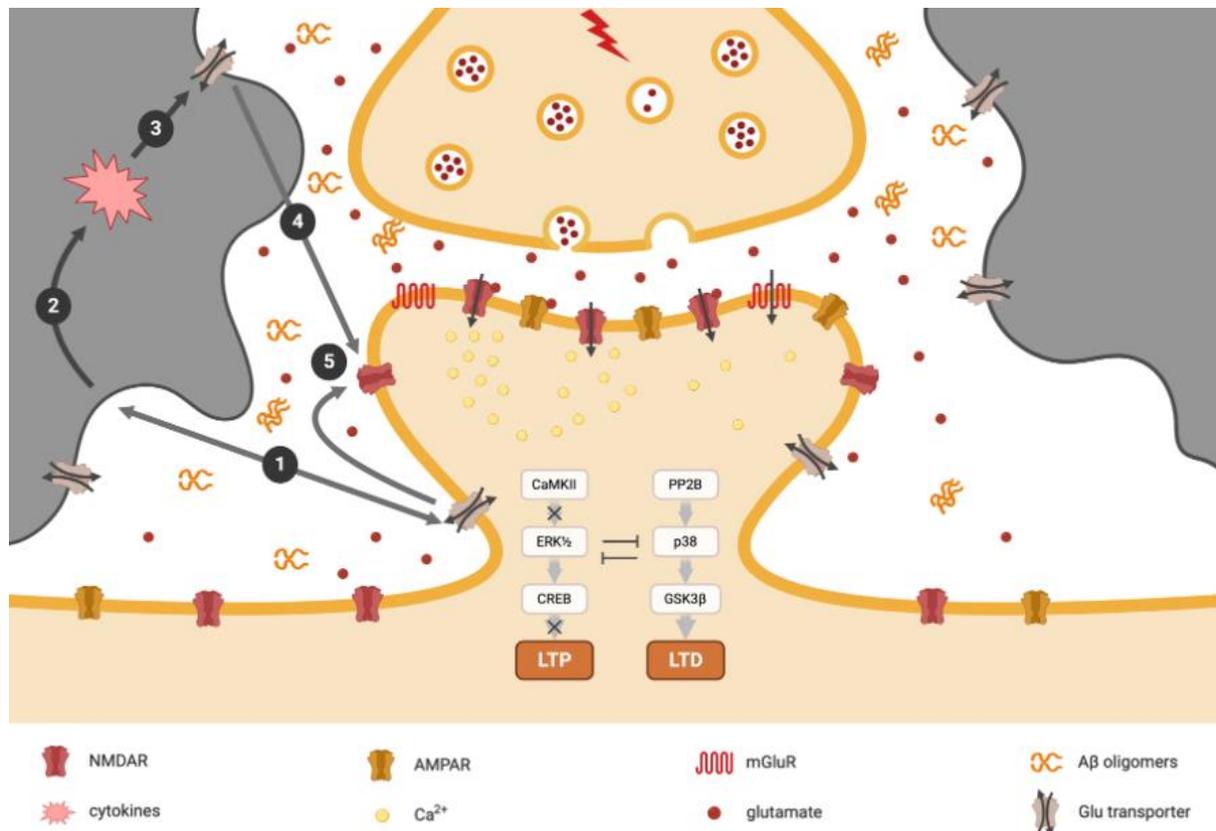
Dans le cerveau adulte, les récepteurs NMDA sont les principaux récepteurs au glutamate à laisser entrer du calcium au niveau post-synaptique. Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence que la sur-activation des récepteurs NMDA par les A $\beta$  conduit à une modification de la signalisation calcique neuronale. Il a notamment été montré que l'application d'A $\beta$  sur des cultures primaires de neurones corticaux induit une augmentation de calcium intracellulaire dépendante des récepteurs NMDA (Ferreira et al. 2015; Amar et al. 2017; Fani et al. 2021). Cette élévation calcique médiée par les récepteurs NMDA a également été retrouvée *in vivo*, dans des cerveaux de souris traités avec des A $\beta$  (Arbel-Ornath et al. 2017). De plus, après 24h de traitement, il a également été observé une diminution du nombre d'épines dendritiques.

Des études électrophysiologiques de LTP et LTD ont mis en lumière le rôle primordial de l'influx calcique médié par les récepteurs NMDA dans les mécanismes de plasticité à long terme (Citri et Malenka 2008; Lau et al. 2009). La perturbation du nombre de récepteurs et de l'homéostasie calcique pourrait donc conduire à une altération de cette plasticité et ainsi des capacités mnésiques. De manière générale, la sur-activation d'un récepteur induit un processus de désensibilisation se traduisant par son internalisation. Une étude réalisée par Snyder et al., 2005 a montré que l'application d'A $\beta$  sur des neurones corticaux en culture favorise l'endocytose des récepteurs NMDA. De même, l'A $\beta$  oligomérique entraîne l'endocytose des récepteurs AMPA provoquant une perte des réponses NMDA et une diminution de la densité synaptique (Hsieh et al. 2006).

L'internalisation des récepteurs AMPA et NMDA ainsi que l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques via les A $\beta$  pourraient participer à ce basculement d'hyper- vers hypoactivité neuronale observé dans la maladie d'Alzheimer. Plusieurs travaux ont mis en évidence une perturbation de la plasticité et la densité synaptique médiée par les A $\beta$  et dépendante des récepteurs NMDA. Il a notamment été montré que l'administration d'oligomères d'A $\beta$  altère la LTP, diminue la transmission synaptique de base et induit une rétraction des synapses. Ces effets ont pu être bloqués par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B (l'ifenprodil ou le Ro 25-6981) (Rönicke et al. 2011). D'autres groupes de recherche ont également confirmé que l'inhibition de la LTP et la diminution de la densité synaptique médiées par les A $\beta$  étaient dépendantes des récepteurs NMDA extra-synaptiques (W. Wei et al. 2010; Shaomin Li et al. 2011). En plus de son effet inhibiteur sur la LTP, les A $\beta$  semblent également avoir un impact sur la LTD. Shankar et al., 2008 a montré qu'un traitement de l'hippocampe ou l'injection dans le ventricule latéral de rat avec des A $\beta$  extraits du cortex de patients Alzheimer inhibe la LTP, favorise la LTD, réduit la densité synaptique et altère les capacités mnésiques. Cette facilitation de la LTD semble impliquer des voies de signalisation mettant en jeu la calcineurine et la protéine GSK-3 $\beta$  (respectivement une phosphatase et une kinase impliquées dans la modulation de la phosphorylation de Tau dont nous parlerons dans la suite du manuscrit) (Shankar et al. 2007; Shaomin Li et al. 2009). Pour résumer, les A $\beta$  semblent donc bloquer la potentialisation et faciliter la dépression synaptique.

Les mécanismes moléculaires présentés ci-dessus mettent en lumière une cascade d'évènements qui pourrait potentiellement expliquer le déclenchement de la maladie d'Alzheimer (**Figure 10**). Les A $\beta$  entraîneraient une accumulation extracellulaire de

glutamate conduisant à la sur-activation des récepteurs NMDA, notamment les récepteurs extra-synaptiques. Cela induirait une modification de la concentration en calcium intracellulaire et l'activation subséquente de cascades de signalisation avec pour conséquence une inhibition de la plasticité à long terme et une favorisation de la dépression synaptique.



**Figure 10 : Hypothèse schématique de la façon dont l'Aβ oligomérique peut perturber la plasticité (adaptée de Li & Selkoe, 2020).** Lorsque les Aβ<sub>o</sub> augmentent ou sont appliqués de manière exogène au milieu de culture, aux tranches de cerveau ou au cerveau intact, les oligomères hydrophobes se colleront potentiellement à la surface de la membrane lipidique neuronale ou gliale (1), interrompant ainsi leurs fonctions normales et stimulant les cellules gliales à libérer des cytokines et des médiateurs inflammatoires associés (2). Cela entraînerait une altération de la recapture du glutamate astrocytaire et/ou neuronal (3) augmentant ainsi la concentration extracellulaire de glutamate (4). Ces concentrations élevées de glutamate extracellulaires activeraient davantage les récepteurs NMDA extra-synaptiques composés de sous-unités NR2B (5) ce qui induirait une altération de la LTP, une facilitation de la LTD ainsi que d'autres effets néfastes pour les neurones.

Bien que l'implication des récepteurs NMDA dans la synaptotoxicité des Aβ<sub>o</sub> soit largement acceptée par la communauté scientifique, d'autres protéines synaptiques sont également la cible de ce peptide telles que les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine α7 (H.-Y. Wang et al. 2000), les récepteurs GABA et AMPA cités précédemment (W.-Q. Zhao et al. 2010; Ulrich

2015), le récepteur métabotrope du glutamate mGluR5 (Renner et al. 2010), PSD95 (postsynaptic density protein 95) (Pham et al. 2010) ou encore la protéine prion cellulaire (PrP<sup>C</sup>) (Rushworth et al. 2013; Um et al. 2012). En condition pathologique, ces protéines constituent un partenaire de liaison potentiel des oligomères d'A $\beta$  dont les interactions pourraient être impliquées dans les dysfonctions structurales et fonctionnelles des synapses conduisant aux troubles cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer (pour revue voir Tu et al., 2014).

Nous avons ainsi présenté différents mécanismes par lesquels les A $\beta$  pourraient initier la maladie d'Alzheimer. Son accumulation dans le cerveau entrainerait une perturbation de l'homéostasie calcique entrainant une hyperactivité neuronale précoce. Cette activation soutenue des neurones conduirait à un phénomène d'excitotoxicité et à la perte subséquente de synapses se répercutant sur l'activité synaptique. S'ensuit alors un basculement de cette hyperactivité vers une hypoactivité neuronale avec notamment une altération de la LTP et une facilitation de la LTD. La perturbation de la plasticité synaptique serait ensuite à l'origine des déficiences mnésiques et cognitives caractéristiques de la pathologie.

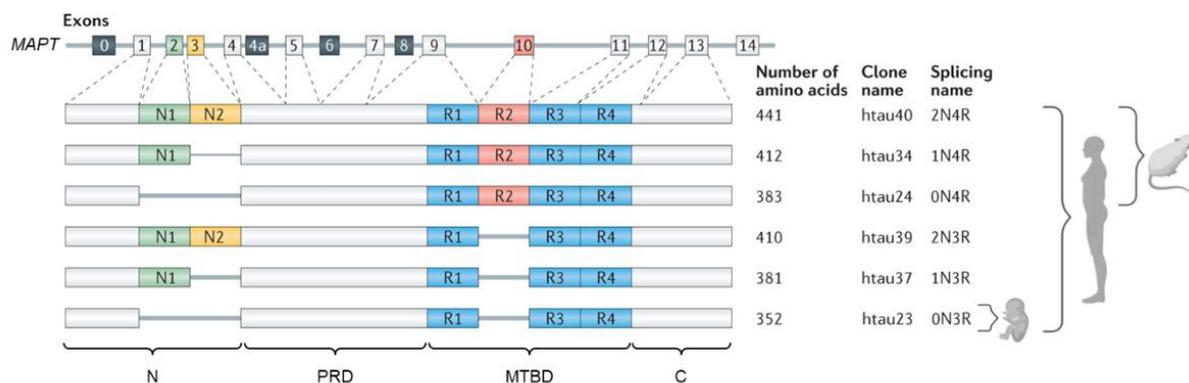
Comme mentionné au début de ce manuscrit, la maladie d'Alzheimer se caractérise neuropathologiquement par une accumulation de peptide  $\beta$ -amyloïde dans le cerveau mais également par l'accumulation intracellulaire d'une autre protéine, à savoir la protéine Tau. Nous allons donc maintenant nous intéresser aux caractéristiques de cette protéine.

### 3) Tau dans la maladie d'Alzheimer

#### a. Structure de la protéine Tau

Tau est une protéine faisant partie de la famille des microtubule-associated protein (MAP) et est essentielle pour l'organisation et la stabilisation des microtubules (Weingarten et al. 1975; G. Lee et Rook 1992). Elle est codée par le gène *MAPT* (microtubule-associated protein tau) qui comprend 16 exons situés sur le chromosome 17q21 chez l'Homme (Neve et al. 1986; Andreadis 2006). Le cerveau adulte humain contient 6 isoformes de Tau, générées par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (**Figure 11**). Des séquences distinctes d'acides aminés codées par les exons 2 et 3 dans la région N-terminale de la protéine Tau sont soit exclues (0N), soit incluses de manière différentielle, donnant lieu aux isoformes 1N (exon 2) ou 2N (exons 2 et 3) de la protéine Tau. L'épissage alternatif de l'exon 10 dans le domaine de liaison aux microtubules (MTBD pour microtubule binding domain) produit les isoformes 3R

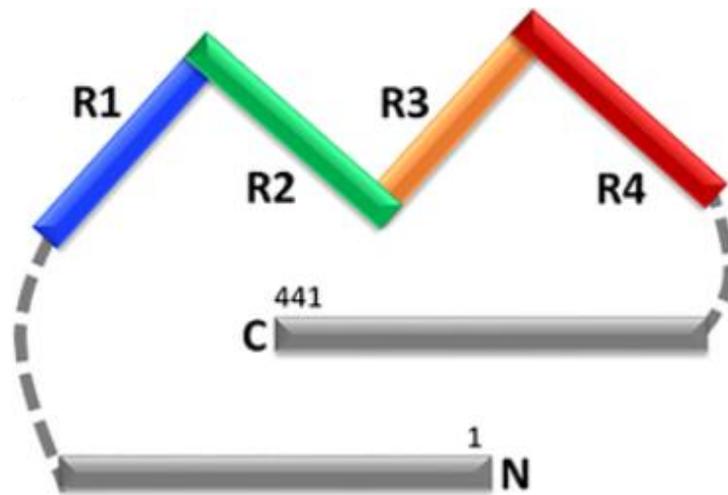
ou 4R selon le nombre de domaines répétés carboxy-terminaux. Les différentes isoformes de Tau sont exprimées différemment en fonction du stade de développement. Ainsi, dans le cerveau foetal humain, seule l'isoforme la plus courte (0N3R) est exprimée alors que dans le cerveau adulte, les 6 isoformes sont exprimées (Goedert et al. 1989). Les isoformes 3R et 4R sont exprimées de manière équivalente alors qu'en ce qui concerne les isoformes liées à l'épissage des exons 2 et 3, l'isoforme 2N est sous-représentée par rapport aux deux autres. Les isoformes 0N, 1N et 2N représentent alors respectivement 37, 54 et 9% de la protéine Tau totale dans le cerveau humain adulte (Goedert et Jakes 1990). Les proportions de chaque isoforme de Tau varient entre les espèces. En effet, le cerveau adulte de souris exprime presque exclusivement les trois isoformes de Tau 4R alors que les isoformes 3R sont exprimées de manière transitoire dans les neurones de souris fœtaux et de nouveau-nés (Kosik et al. 1989; Llorens-Martin et al. 2012).



**Figure 11 : Domaines de la protéine Tau et épissage alternatif dans le cerveau humain (adaptée de Y. Wang & Mandelkow, 2016 et Kent et al., 2020).** *MAPT*, le gène codant pour la protéine Tau humaine contient 16 exons. Les exons 1 (E1), E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E13 sont constitutifs tandis que les autres sont soumis à un épissage alternatif. E0 et E1 codent les séquences 5' non traduites de l'ARNm *MAPT*, tandis que E14 fait partie de la région 3' non traduite. E0 fait partie du promoteur qui est transcrit mais non traduit. Le codon d'initiation de la traduction ATG se trouve dans E1. E4a, E6 et E8 ne sont transcrits que dans le système nerveux périphérique. Les six isoformes de Tau du cerveau humain sont générées par épissage alternatif de E2, E3 et E10. Ces isoformes diffèrent en fonction de la présence de 0, 1 ou 2 inserts amino-terminaux (respectivement 0N, 1N ou 2N) et de la présence ou non de la répétition R2 donnant des isoformes de Tau à 3 ou 4 domaines de répétition carboxy-terminaux (respectivement 3R ou 4R). L'expression de la protéine Tau est régulée par le développement : dans le cerveau humain foetal, seule la protéine Tau 0N3R est exprimée alors que dans le cerveau adulte humain, les six isoformes sont exprimées. Le cerveau de souris et rat adulte exprime presque exclusivement les isoformes 4R de Tau. N : N-terminal, PRD : domaine riche en proline, MTBD : domaine de liaison aux microtubules, C : C-terminal.

Tau est une protéine hydrophile composée de quatre domaines majeurs qui se distinguent par leurs propriétés biochimiques. On trouve le domaine de projection N-terminal qui tire son nom du fait qu'il ne se lie pas aux microtubules mais s'en éloigne (Hirokawa, Shiomura, et Okabe 1988). Il contient les inserts 1N et 2N composés d'acides aminés principalement acides alors que le domaine C-terminal est, lui, globalement neutre. Entre ces domaines N et C-terminaux se trouve le domaine riche en proline contenant 7 motifs PXXP (P pour l'acide aminé proline et X correspond à n'importe quel acide aminé). Ces derniers servent de sites de liaison pour d'autres protéines avec un domaine Src homology 3 (SH3) telles que la tyrosine kinase Fyn (G. Lee et al. 1998). Enfin, on trouve le domaine de liaison aux microtubules composé de 3 ou 4 motifs répétés qui permet la liaison de la protéine Tau aux microtubules et favorise leur assemblage (Steiner et al. 1990).

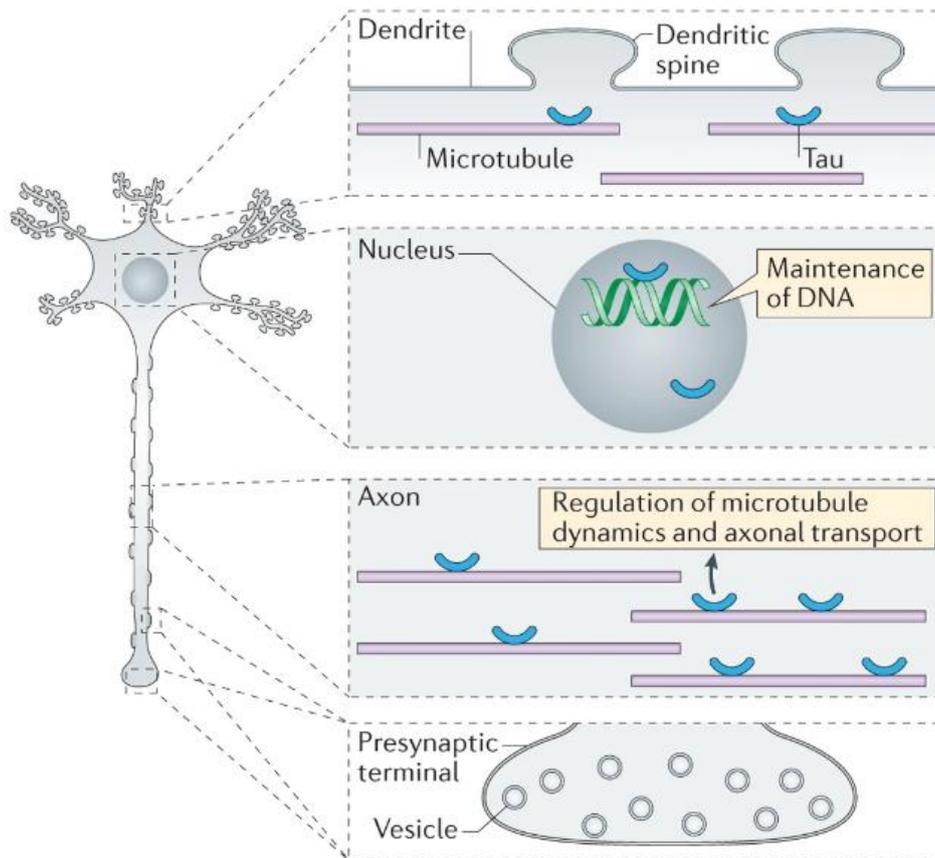
Des études biophysiques ont montré que la protéine Tau est « nativement dépliée » ou « intrinsèquement désordonnée ». C'est donc une protéine extrêmement flexible et mobile ne contenant que peu de structures secondaires (Schweers et al. 1994; Mukrasch et al. 2009). Ceci lui permettrait de former des interactions transitoires avec une multitude d'autres protéines dans la cellule. Il a notamment été montré que lorsque Tau se lie à d'autres protéines telles que les microtubules, elle prend une certaine conformation lui permettant ces interactions (Grüning et al. 2014; Kadavath et al. 2015). En dépit de son caractère désordonné, Tau montre une préférence pour un repliement localisé afin d'adopter une conformation dite en « trombone » dans laquelle l'extrémité C-terminale se replie sur le MTBD et l'extrémité N-terminale se replie sur l'extrémité C-terminale rapprochant ainsi les deux extrémités (**Figure 12**) (Jeganathan et al. 2006).



**Figure 12 : Modèle d'interactions intramoléculeaires au sein de la protéine tau soluble (adaptée de Zabik et al., 2017).** La chaîne polypeptidique de Tau 4R est représentée avec des répétitions de couleurs différentes (R1 en bleu, R2 en vert, R3 en jaune et R4 en rouge) et les séquences N- et C-terminales adjacentes en gris. L'extrémité C-terminale se replie à proximité du domaine de répétition et l'extrémité N-terminale se replie sur l'extrémité C-terminale.

#### b. Rôle physiologique de Tau

La protéine Tau est majoritairement présente dans le système nerveux central et périphérique mais peut également être retrouvée, dans une moindre mesure, dans d'autres tissus tels que les reins, les poumons ou encore le cœur (Gu, Oyama, et Ihara 1996). Dans le cerveau, Tau est particulièrement exprimée dans les neurones et plus faiblement dans les astrocytes et les oligodendrocytes (Papasozomenos et Binder 1987; LoPresti et al. 1995; Müller et al. 1997). Au sein des neurones, Tau est principalement localisée au niveau des axones (Trojanowski et al. 1989) mais peut également être trouvée dans les dendrites ou le noyau (Loomis et al. 1990; Tashiro et al. 1997). A l'origine, Tau a été identifiée comme une protéine associée aux microtubules. Au fil du temps, plusieurs nouvelles fonctions de cette protéine ont été mises en évidence, autres que la stabilisation des microtubules. Nous allons donc nous intéresser aux différentes fonctions de Tau dans les différents compartiments subcellulaires (**Figure 13**).



**Figure 13 : Fonctions physiologiques de Tau dans les neurones (adaptée de Y. Wang & Mandelkow, 2016).** En condition physiologique, la protéine Tau se répartit principalement dans les axones et joue un rôle important dans la stabilisation des microtubules. Outre la régulation de la dynamique des microtubules, la protéine Tau peut réguler le transport axonal par différents mécanismes. Une petite quantité de protéine Tau est détectée dans les dendrites et les synapses où elle pourrait avoir un rôle dans la plasticité synaptique, bien que sa fonction exacte demeure incertaine. La protéine Tau est également présente dans le noyau où elle pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'ADN génomique.

L'une des caractéristiques de Tau la plus décrite est sans nul doute son interaction avec les microtubules conduisant à leur stabilisation et favorisant leur assemblage. Les microtubules sont des polymères protéiques composant le cytosquelette et intervenant notamment dans la structure cellulaire et le transport axonal. Drechsel et al., 1992 ont montré que la protéine Tau est capable de stabiliser les microtubules, notamment en diminuant la fréquence des phénomènes de catastrophe (dépolymérisation massive et soudaine des microtubules). Cette diminution de ces phénomènes pourrait être liée à un rôle de Tau dans le recrutement de protéines de liaison terminale (EBs pour end-binding proteins) sur le faisceau stable des microtubules, empêchant ces EBs de se fixer aux extrémités des microtubules et d'augmenter ainsi la fréquence des catastrophes (Ramirez-Rios et al. 2016).

La capacité de Tau à se lier aux microtubules, impliquant ses fonctions de stabilisation et d'assemblage des microtubules, dépend de son MTBD (domaines répétés) et des régions adjacentes à ce domaine de liaison (Gustke et al. 1994). En effet, le nombre de domaines répétés au sein du MTBD aurait un impact sur la capacité de Tau à réguler les microtubules. Goedert & Jakes, 1990 ont montré que l'isoforme de Tau 4R contenant le domaine R2 a une plus forte affinité pour les microtubules que l'isoforme 3R ce qui favorise leur assemblage (2,5 à 3 fois plus rapide). Bien que les deux isoformes 3R et 4R peuvent réduire la concentration critique nécessaire pour l'assemblage de la tubuline (protéine constituant les microtubules) et favoriser ainsi la polymérisation des microtubules, l'isoforme 4R est plus efficace que la 3R (Panda et al. 2003). Ce groupe de chercheurs a également montré que Tau 3R et 4R augmentent le taux de croissance des microtubules dans des proportions similaires. Cependant, l'isoforme 3R ne protège pas efficacement les microtubules de la dépolymérisation, contrairement à l'isoforme 4R. La protéine Tau 3R semble donc avoir un effet stabilisateur des microtubules plus faible que Tau 4R et cette différence de propriété pourrait être importante lorsque des microtubules dynamiques sont nécessaires.

Outre son rôle de régulation de la dynamique des microtubules, Tau est capable de réguler le transport axonal en influençant la fonction des protéines motrices dynéine et kinésine, qui permettent respectivement le transport d'organites (ou de cargos) vers l'extrémité (-) (c'est-à-dire vers le centrosome) ou vers l'extrémité (+) (c'est-à-dire vers la terminaison axonale) des microtubules. Plusieurs études ont notamment montré que Tau pouvait entrer en compétition avec ces protéines motrices pour la liaison aux microtubules et ainsi ralentir le transport antérograde et rétrograde (Ebner et al. 1998; Dixit et al. 2008). La surexpression de Tau dans des neurones hippocampiques de rongeur en culture a mis en avant un effet inhibiteur plus prononcé sur la kinésine que la dynéine entraînant une accumulation des organites dans le soma des cellules (Stamer et al. 2002). Une étude *in vitro* a suggéré que Tau pouvait également réguler le transport axonal en réduisant le nombre de kinésines engagées dans le transport d'organites (Vershinin et al. 2007). De plus, Tau pourrait empêcher le transport d'organites en entrant en compétition avec ces cargos pour l'interaction avec la kinésine (Utton et al. 2005), ou en activant la protéine phosphatase 1 (PP1) et la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) par l'intermédiaire des 18 résidus situés à l'extrémité N-terminale de Tau conduisant à la libération des vésicules cargos des chaînes légères de la kinésine (Kanaan et al. 2011). De même, le domaine N-terminal de Tau peut se lier à la sous-unité p150 de la dynactine, une protéine permettant la liaison des cargos à la dynéine, et ainsi stabiliser

l'interaction de la dynéine avec les microtubules et favoriser le transport axonal (Magnani et al. 2007). Bien que ces études *in vitro* ou dans des cellules en culture mettent en évidence un rôle important de Tau dans le transport axonal, la suppression ou la surexpression de Tau *in vivo*, chez la souris, n'a montré que peu d'influence sur le transport axonal (Yuan et al. 2008). Ceci pourrait s'expliquer par un rôle non essentiel de Tau dans ce transport ou par la mise en place de mécanismes compensatoires permettant de limiter l'impact de la protéine Tau sur le transport axonal. L'un des mécanismes proposés serait une rapide interaction dite « kiss-and-hop » de la protéine Tau avec les microtubules favorisant leur assemblage sans obstruer les sites de liaison des protéines motrices et donc sans interférer avec le transport axonal (Janning et al. 2014).

En condition physiologique, Tau est principalement localisée dans l'axone (Aronov et al. 2001) et en quantité nettement inférieure dans les dendrites et les épines (Ittner et al. 2010). Son rôle exact dans ces compartiments subcellulaires n'est cependant pas encore bien caractérisé du fait de la variabilité des résultats obtenus avec les souris Tau KO (knock-out) et de la compensation potentielle d'autres MAPs qui pourrait masquer l'effet de l'absence de Tau (Morris et al. 2013; Lei et al. 2014; Ma et al. 2014). Plusieurs travaux ont toutefois montré un rôle de Tau dans la plasticité synaptique. Une étude réalisée au sein de l'équipe a notamment permis d'observer une translocation de Tau dans le compartiment post-synaptique lors de l'activation neuronale pharmacologique de neurones de souris en culture ou lors d'un processus de LTP dans des tranches d'hippocampes de souris (Frändemichie et al. 2014). En outre, l'inactivation aiguë de la protéine Tau dans l'hippocampe de souris adultes par l'injection stéréotaxique d'un shRNA (short hairpin RNA) viral entraîne une diminution de la densité synaptique, une réduction de l'expression de protéines pré- et post-synaptiques (synaptophysine et PSD95), ainsi qu'une altération de la coordination motrice et de la mémoire spatiale qui ont pu être restaurées en bloquant l'expression de ce shRNA (Velazquez et al. 2018). Tandis qu'une seule étude a révélé un déficit sévère de LTP chez les souris Tau KO (T. Ahmed et al. 2014), d'autres travaux ont montré l'implication de Tau dans la LTD, potentiellement via sa phosphorylation sur la sérine 396 par GSK-3 $\beta$  permettant l'internalisation des récepteurs AMPA (Kimura et al. 2014; Regan et al. 2015). Ces altérations de la neurotransmission observées en l'absence de Tau pourraient s'expliquer par un rôle de protéine d'échafaudage modulant ainsi la neurotransmission. Ces interactions impliqueraient notamment la tyrosine kinase Fyn et le complexe PSD95 – récepteurs NMDA (Mondragón-Rodríguez et al. 2012). Tau permettrait la translocation de Fyn aux épines dendritiques où

cette kinase phosphorylerait la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA participant ainsi à la plasticité synaptique (Ittner et al. 2010). La protéine Tau peut également interagir avec les filaments d'actine, le principal constituant cytosquelettique des épines dendritiques (Hering et Sheng 2001; He et al. 2009; Frandemiche et al. 2014). Cette interaction s'effectue via au moins deux domaines répétés du MTBD de Tau ce qui pourrait relier les microtubules et l'actine via ces domaines (Elie et al. 2015). Tau représenterait donc un lien moléculaire entre les réseaux d'actine et de microtubules permettant la coordination des deux cytosquelettes qui pourrait par exemple être importante pour le maintien des synapses.

Alors que la majorité de la protéine Tau est exprimée dans le cytosol, de nombreuses études ont démontré la présence de Tau au niveau nucléaire dans des lignées cellulaires (Loomis et al. 1990; Maina et al. 2018), des cultures primaires de neurones (Gómez De Barreda et al. 2010) ainsi que dans le cerveau de souris (Violet et al. 2014) et humain (Rady, Zinkowski, et Binder 1995; Eftekhazadeh et al. 2018). *In vitro*, Tau est capable de se lier à l'ARN et l'ADN (Bryan, Nagle, et Doenges 1975; Camero et al. 2014). Dans le noyau, Tau aurait un rôle de protection de l'ADN en empêchant ses dommages et en favorisant sa réparation (Y. Wei et al. 2008). Sultan et al., 2011 a notamment montré qu'un stress cellulaire induit par un choc thermique ou par des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) entraîne une accumulation de Tau déphosphorylée dans le noyau des neurones et augmente la capacité de Tau à se lier à l'ADN. Ils ont également montré que Tau protège l'ADN des dommages engendrés par un choc thermique dans des neurones de souris wild-type (WT) contrairement aux neurones de souris déficientes en Tau. La surexpression de Tau humaine ciblée au niveau nucléaire dans ces neurones de souris déficientes en Tau a permis de complètement réparer les lésions induites par ce choc thermique. En plus de maintenir l'intégrité du génome, Tau pourrait réguler la transcription de gènes impliqués dans les fonctions neuronales. Récemment, une étude a rapporté que l'inactivation de Tau dans les neurones via un shRNA (short hairpin RNA) réduit considérablement les niveaux d'ARNm (ARN messenger) et protéique de VGluT1 (vesicular glutamate transporter 1), une protéine impliquée dans la transmission synaptique glutamatergique (Siano et al. 2019). Au contraire la surexpression de la protéine Tau ou l'induction de la translocation de Tau dans le noyau entraîne une augmentation de la transcription de VGluT1.

Je vous ai présenté ici un panel non exhaustif des différentes fonctions de la protéine Tau dans les neurones. Tau est notamment impliquée dans la stabilisation et l'assemblage des microtubules, le transport axonal, la protection et la régulation de l'ADN. En condition



seulement 5 résidus tyrosines représentant respectivement 53, 41 et 6% des résidus phosphorylables sur Tau. Parmi ces 85 sites putatifs, environ 45 sites ont été répertoriés dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Hanger, Anderton, et Noble 2009). La phosphorylation de la protéine Tau est étroitement régulée par de nombreuses kinases et phosphatases et chaque site de phosphorylation peut être la cible d'une ou plusieurs enzymes (Hanger, Anderton, et Noble 2009; Y. Yu et al. 2009). Les kinases de Tau peuvent être classées en trois grands groupes :

- Les PDPKs (proline-directed protein kinases) dirigées contre des résidus sérines ou thréonines suivis d'une proline. On trouve notamment GSK-3 $\beta$  (Lovestone et al. 1996), Cdk5 (cyclin-dependent kinase-5) (Cruz et al. 2003), l'AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Mairet-Coello et al. 2013), ou encore les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) (Feijoo et al. 2005) ;
- Les non-PDPKs qui phosphorylent des résidus sérines ou thréonines non suivis d'une proline telles que les MARKs (microtubule affinity-regulating kinases) (Drewes et al. 1995), CK1 (casein kinase 1) (Hanger et al. 2007), la PKA (cyclic AMP-dependent protein kinase A) (D. Wang et al. 2013), ou encore la CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II) (Litersky et al. 1996) ;
- Les kinases spécifiques des résidus tyrosines telles que Fyn (Gloria Lee et al. 2004), c-Abl (Derkinderen et al. 2005) ou encore Syk (spleen tyrosine kinase) (Lebouvier et al. 2008).

Plusieurs phosphatases peuvent également réguler la phosphorylation de Tau dont les protéines phosphatases (PPs) PP1, PP2A, PP2B, PP5, PP2A représentant plus de 70% de l'activité phosphatase de Tau dans le cerveau humain (F. Liu, Grundke-Iqbal, et al. 2005).

La phosphorylation joue un rôle crucial dans la régulation des fonctions physiologiques de Tau, notamment sa liaison aux microtubules, régulant ainsi leur stabilisation et leur assemblage. En effet, de nombreuses études ont montré que la phosphorylation de Tau sur différents résidus diminue son affinité pour les microtubules réduisant ainsi leur stabilité (Drewes et al. 1995; Sengupta et al. 1998; Schneider et al. 1999; Cho et Johnson 2003; Fischer et al. 2009). Par exemple, la phosphorylation des Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356 trouvées respectivement dans les motifs KXGS des domaines répétés R1, R2, R3 et R4 conduit à une diminution de l'interaction de Tau avec les microtubules. De même, la phosphorylation des Ser214 et Thr231 dans la région adjacente au MTBD de Tau entraîne son détachement des microtubules. Une autre étude a montré que la phosphorylation de Tau sur sa tyrosine 18 module le transport axonal en favorisant la motilité de la kinésine-1 (Stern et al. 2017).

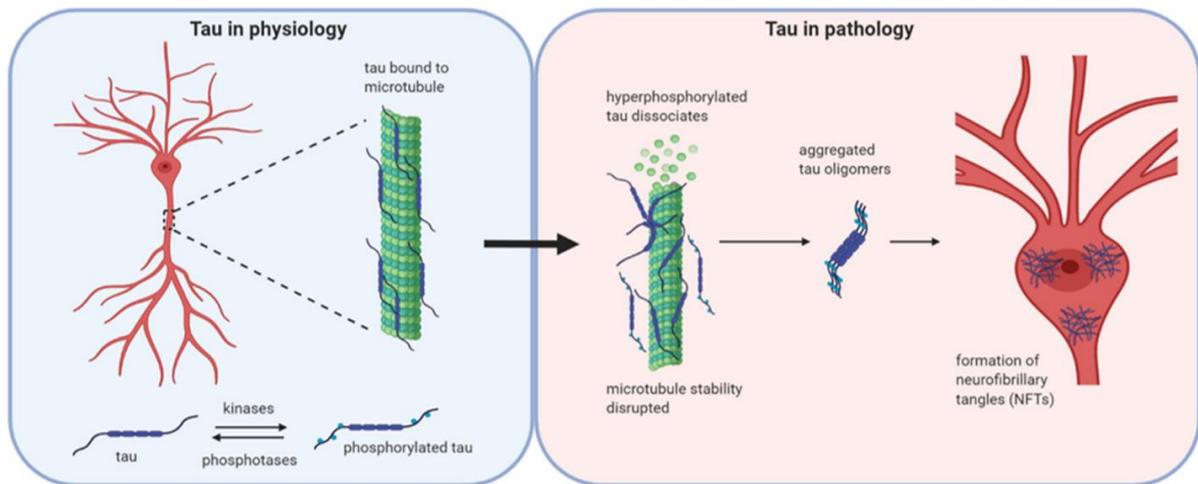
Il semblerait donc que le niveau de phosphorylation de Tau soit principalement déterminé par un équilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases. La perturbation de cet équilibre, via une sous-activité des phosphatases ou une sur-activité des kinases, pourrait contribuer à la phosphorylation anormale de la protéine Tau observée dans la maladie d'Alzheimer. Cet état d'hyperphosphorylation va entraîner des effets néfastes pour les neurones, notamment la déstabilisation des microtubules, ainsi que la troncation et l'agrégation de la protéine Tau conduisant *in fine* à la perte de fonctions neuronales et la mort cellulaire. Ce sont ces processus neuropathologiques qui vont nous intéresser dans la suite de ce manuscrit.

#### d. Mécanismes d'agrégation de la protéine Tau

L'une des caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer est l'agrégation intraneuronale de protéines Tau anormalement hyperphosphorylées formant des dégénérescences neurofibrillaires. Cette agrégation de protéine Tau en DNFs caractérise de nombreuses maladies neurodégénératives connues sous le nom de tauopathies. Parmi ces pathologies, on retrouve la maladie d'Alzheimer, la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence cortico-basale ou encore la démence frontotemporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (V. M. Lee, Goedert, et Trojanowski 2001). Dans ce présent manuscrit, nous allons nous concentrer sur les mécanismes par lesquels la protéine Tau forme ces agrégats et les conséquences neuropathologiques de cette agrégation dans la maladie d'Alzheimer.

L'analyse de cerveaux de patients Alzheimer a mis en évidence la présence d'agrégats de protéines Tau anormalement hyperphosphorylées (Grundke-Iqbal et al. 1986). En effet, une étude *in vitro* a montré qu'une protéine Tau extraite d'un homogénat de cerveau Alzheimer était phosphorylée environ 4 fois plus qu'une protéine Tau d'un cerveau de sujet sain (Köpke et al. 1993). De plus, il semblerait qu'au cours du développement de la pathologie, des phosphorylations sur certains sites spécifiques favorisent son agrégation et le développement de DNFs (Aragão Gomes et al. 2021). Ainsi, les lésions initiales comporteraient la protéine Tau diffuse phosphorylée sur sa Thr231 dans le compartiment somotadendritique, et de la Tau phosphorylée sur sa Ser396 et 404 au niveau axonal. Puis, au cours de l'agrégation de la protéine Tau, la phosphorylation des sites Ser202 et Thr205 a été identifiée avant la formation de DNFs. La formation d'agrégats de Tau corrèle également avec l'augmentation de

sa phosphorylation sur ses tyrosines dans un modèle de souris tauopathique (Vega et al. 2005). Il semblerait donc que la phosphorylation de la protéine Tau joue un rôle essentiel dans les processus d'agrégation (**Figure 15**).



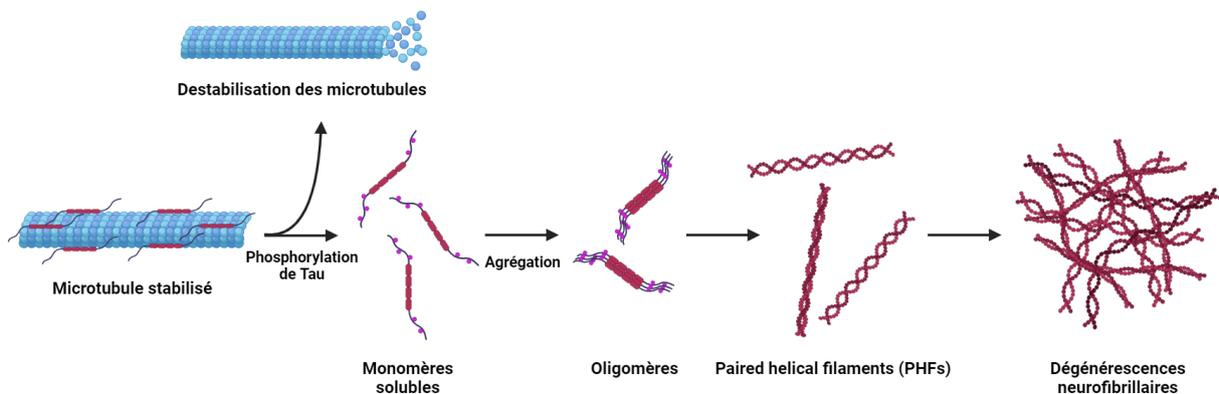
**Figure 15 : Tau en physiopathologie (adaptée de Hill et al., 2020).** En condition physiologique, la protéine Tau est liée aux microtubules. La stabilité des microtubules est maintenue par un équilibre de l'activité des kinases et des phosphatases régulant la liaison de Tau aux microtubules. Si l'équilibre est modifié en faveur d'une augmentation de l'activité des kinases ou d'une diminution de l'activité des phosphatases, la protéine Tau peut devenir hyperphosphorylée et se détacher des microtubules, affectant leur stabilité et favorisant l'agrégation de la protéine Tau.

Comme mentionné précédemment, le niveau de phosphorylation de Tau repose sur un équilibre entre l'activité d'un ensemble de kinases et de phosphatases. L'analyse *post mortem* de cerveaux de patients Alzheimer démontre une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de certaines kinases de Tau telles que GSK-3 $\beta$  (Hye et al. 2005; Leroy, Yilmaz, et Brion 2007), les MAPKs (Swatton et al. 2004), ou encore CK1 (Yasojima et al. 2000) suggérant l'implication de plusieurs kinases dans l'hyperphosphorylation de Tau. GSK-3 $\beta$  semble particulièrement impliquée dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer puisque des travaux sur des souris transgéniques ont montré que l'inhibition de cette kinase réduit la phosphorylation de Tau (Caccamo et al. 2007), empêche la formation de DNFs (Engel et al. 2006) et restaure la perte neuronale (Serenó et al. 2009). L'hyperphosphorylation de Tau peut également résulter de l'inhibition de phosphatases. Ainsi, dans le cerveaux de patients Alzheimer, l'activité de PP2A et PP5 est respectivement réduite d'environ 50 et 20% (F. Liu, Grundke-Iqbal, et al. 2005; F. Liu, Iqbal, et al. 2005). De plus, l'incubation d'agrégats de protéines Tau phosphorylées provenant du cytosol de cerveaux Alzheimer avec PP2A inhibe

son agrégation et restaure sa capacité à lier la tubuline et à promouvoir son assemblage (J.-Z. Wang, Grundke-Iqbal, et Iqbal 2007).

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau s'assemble en structures fibrillaires appelées PHFs (paired helical filaments) pour former des DNFs. Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette agrégation restent incertains. Les séquences VQIINK et VQIVYK localisées respectivement au début des domaines R2 et R3 ont une forte propension à former des structures en feuillets  $\beta$  et seraient donc essentielles pour l'agrégation de la protéine Tau (von Bergen et al. 2001; Von Bergen et al. 2000). L'utilisation d'inhibiteurs structuraux ciblant la séquence VQIINK ou l'introduction de résidus prolines dans le MTBD permettant de casser ces structures en feuillets  $\beta$  empêche la formation d'agrégats de Tau (Lathuilière et al. 2017; Seidler et al. 2018). Les PTMs pourraient également affecter l'agrégation de Tau. Puisque les agrégats de Tau chez les patients présentant une tauopathie ou dans des souris transgéniques sont hyperphosphorylés et que l'hyperphosphorylation de Tau précède l'agrégation (Braak et Braak 1991), la phosphorylation est supposée être à l'origine de l'agrégation. Cependant, cela fait toujours l'objet de débats en partie en raison du nombre et de l'hétérogénéité des sites de phosphorylation de Tau. Alors que certaines formes phosphorylées de Tau sont sujettes à l'agrégation et que la protéine Tau anormalement hyperphosphorylée isolée de cerveaux humains Alzheimer peut s'auto-assembler en PHFs *in vitro* (Alonso et al. 2001), d'autres sites de phosphorylation tels que les sérines 214, 262 ou 305, protègeraient Tau de l'agrégation (Schneider et al. 1999; Strang et al. 2019). De même, la phosphorylation de Tau dans les régions riches en proline altère son activité d'assemblage des microtubules et favorise de manière subtile la propension de Tau à s'agréger (Eidenmüller et al. 2001). En revanche, sa phosphorylation dans la région C-terminale favorise fortement son agrégation (F. Liu et al. 2007). Ces données suggèrent que la phosphorylation de Tau sur des sites spécifiques régule différemment sa liaison aux microtubules et son agrégation. D'autres cofacteurs pourraient également être impliqués dans le processus d'agrégation de Tau. Des études *in vivo* ont rapporté une hyperphosphorylation de Tau similaire à celle que l'on trouve dans la maladie d'Alzheimer sans aucune agrégation chez les animaux en hibernation ou lors d'une hyperthermie induite par l'anesthésie (Arendt et al. 2003; Planel et al. 2007). Cette hyperphosphorylation physiologique pourrait s'expliquer par le fait que l'hypothermie inhibe les phosphatases de manière exponentielle alors qu'elle inhibe l'activité kinase de manière linéaire (Planel et al. 2004). A l'inverse, l'agrégation de Tau peut être induite *in vitro* par des cofacteurs polyanioniques indépendamment de toute phosphorylation (Goedert et al. 1996).

Ainsi, il semblerait que la phosphorylation seule ne soit pas suffisante pour induire l'agrégation de Tau. On peut envisager la présence de cofacteurs qui induiraient spécifiquement cette agrégation alors que sa phosphorylation, probablement sur des sites spécifiques, pourrait accélérer ce processus de manière indirecte, par exemple en dissociant la protéine Tau des microtubules libérant ainsi davantage de Tau soluble disponible pour l'agrégation (**Figure 16**). En effet, Fischer et al., 2009 a montré que la pseudo-phosphorylation sur la sérine 262 de la protéine Tau induit des changements conformationnels altérant ainsi sa liaison aux microtubules.



**Figure 16 : Modèle du processus d'agrégation de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer.** En condition physiologique, Tau stabilise les microtubules. Dans la maladie d'Alzheimer, certains cofacteurs et/ou modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation conduisent à la dissociation de la protéine Tau des microtubules entraînant leur déstabilisation. Les monomères solubles de Tau vont s'agréger pour former des oligomères, des PHFs et enfin des dégénérescences neurofibrillaires.

Les DNFs ont longtemps été considérées comme toxiques pour les neurones. Cependant, un certain nombre d'études ont mis en évidence que les formes les plus toxiques de Tau seraient, comme pour le peptide  $\beta$ -amyloïde, les formes oligomériques solubles plutôt que les formes fibrillaires (pour revues voir Brunden et al., 2008; Spire-Jones et al., 2011; Cowan & Mudher, 2013). Cette hypothèse fait, à l'heure actuelle, toujours l'objet de débats et le rôle exact des différentes formes de Tau reste à élucider.

De multiples formes tronquées de la protéine Tau ont été observées dans les DNFs de cerveaux Alzheimer (Horowitz et al. 2004; Basurto-Islas et al. 2008). Ce phénomène pourrait être à l'origine de fragments de Tau avec une inclinaison plus importante pour l'agrégation, probablement en raison de l'altération de la structure en trombone de Tau dont nous avons parlé précédemment. L'étude de PHFs provenant de cerveaux de patients Alzheimer a mis en

évidence la présence de deux fragments de Tau tronqués (Wischik et al. 1988). L'un de ces fragments, Tau<sub>151-391</sub>, semble sujet à l'agrégation puisque l'expression de ce fragment humain dans le cerveau de rats entraîne l'apparition de DNFs (Zilka et al. 2006). Dans une autre étude utilisant le même modèle de rat, l'extraction de ce fragment Tau<sub>151-391</sub> humain a montré que ces formes tronquées co-agrègent avec la protéine Tau endogène de rat (Filipcik et al. 2012). Ces données soulignent que la troncation de Tau peut également faciliter le changement de conformation et donc l'agrégation de la protéine Tau intacte entraînant la formation de DNFs. La troncation de Tau résulte d'un clivage protéolytique par des protéases. De nombreuses protéases ciblant Tau ont été identifiées dont les caspases, les calpaïnes, la thrombine, les cathepsines, l'asparagine endopeptidase ou encore les protéases protéasomales (pour revues voir Hanger & Wray, 2010 et Y. Wang et al., 2010). Dans des cerveaux Alzheimer humains et dans un modèle de souris tauopathique, la protéine Tau peut être clivée par la caspase 3 pour générer le fragment Tau<sub>1-421</sub> sujet à l'agrégation et la formation subséquente de DNFs (De Calignon et al. 2010). De même, Tau peut être tronquée *in vitro* au niveau de l'asparagine 255 et 368 par l'asparagine endopeptidase lysosomale. La troncation au niveau de l'asparagine 368 observée chez les patients Alzheimer et dans un modèle de souris tauopathique produit le fragment Tau<sub>1-368</sub> qui présente une activité d'assemblage des microtubules altérée, contribuant potentiellement à l'agrégation de la protéine Tau et à la neurodégénérescence (Z. Zhang et al. 2014).

Nous avons donc montré l'implication de différents mécanismes tels que la phosphorylation et la troncation dans l'agrégation de la protéine Tau et la formation de DNFs, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Nous allons maintenant nous intéresser aux conséquences physiopathologiques de cette agrégation conduisant à la mort neuronale.

#### e. Neurotoxicité de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer : une coopération entre les protéines A $\beta$ et Tau

Comme mentionné au début de ce manuscrit, la maladie d'Alzheimer se caractérise par l'accumulation de deux protéines dans le cerveau : le peptide  $\beta$ -amyloïde et la protéine Tau. La communauté scientifique a longtemps considéré l'accumulation d'A $\beta$  comme point de départ d'une cascade de processus physiopathologiques conduisant à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et la formation de DNFs, entraînant une défaillance du système neuronal, une neurodégénérescence et finalement le déclin cognitif : c'est l'hypothèse de la cascade

amyloïde (D. J. Selkoe 1991; Hardy et Higgins 1992). Les DNFs ne seraient donc que la conséquence des propriétés toxiques de l'A $\beta$ . Cependant, il est aujourd'hui largement accepté une interaction synergique entre les voies de signalisation A $\beta$  et Tau dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Small et Duff 2008). En effet, de nombreuses études ont mis en exergue la coopération des protéines A $\beta$  et Tau dans l'induction des effets neurotoxiques et cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer. Des expériences d'immunohistologie et de co-immunoprécipitation sur des cerveaux de patients Alzheimer et de différents modèles de souris transgéniques ont identifié une interaction entre les protéines A $\beta$  et Tau phosphorylée qui augmente progressivement avec l'évolution de la maladie (Manczak et Reddy 2013). Une expérience réalisée sur des souris transgéniques exprimant l'APP humaine a mis en évidence l'implication de la protéine Tau dans les effets toxiques de l'A $\beta$  sur les neurones. Roberson et al., 2007 ont montré que la réduction de l'expression de Tau endogène dans ces souris transgéniques prévenait la survenue des troubles comportementaux et protégeait les neurones de l'excitotoxicité induite par l'A $\beta$ . De même, l'utilisation d'un anticorps spécifique des oligomères de Tau dans un modèle de souris transgénique surproduisant l'A $\beta$  reverse les déficits cognitifs caractéristiques de ce modèle (Castillo-Carranza et al. 2015). Une autre étude réalisée dans un modèle de rat reproduisant le stade prodromal de la maladie d'Alzheimer a rapporté que l'inhibition de la phosphorylation de Tau par un inhibiteur de la protéine kinase DYRK1A empêche ce modèle de rat d'entrer dans le stade prodromal de la maladie (Souchet et al. 2022). Un groupe de chercheur a développé un modèle de souris transgénique qui exprime la protéine Tau humaine ainsi que de faible quantité d'APP portant la mutation Arctic (que l'on peut retrouver dans les cas de maladie d'Alzheimer familiale) afin de favoriser la formation d'A $\beta$  oligomérique soluble (Chabrier et al. 2012). En diminuant partiellement l'expression de BACE et ainsi la quantité d'oligomères d'A $\beta$ , ils ont observé une diminution de l'accumulation de Tau et de sa phosphorylation dans le cerveau et la restauration des fonctions cognitives. Au contraire, l'injection intracérébrale d'A $\beta$  fibrillaire dans des souris exprimant un mutant de la protéine Tau ou l'accumulation d'A $\beta$  dans des souris doublement transgéniques pour les protéines APP et Tau conduit à une augmentation de la formation de DNFs (Götz et al. 2001; Lewis et al. 2001; Bennett et al. 2017). L'A $\beta$  semble donc accélérer la formation des lésions pathologiques de Tau. Des études *in vitro* et dans les neurones corticaux en culture ont montré que l'A $\beta$  fibrillaire était capable d'induire la formation de filaments de protéines Tau en déclenchant le clivage de Tau par des caspases au niveau de l'asparagine 421 produisant ainsi une forme tronquée de Tau où il manque les 20 acides aminés de son

extrémité C-terminale (Gamblin et al. 2003). Cette protéine tronquée favorisant l'oligomérisation de Tau a été retrouvée dans le cerveau de patients Alzheimer. Des expériences de culture cellulaire ont également montré que les A $\beta$  entraînaient une hyperphosphorylation de Tau, une perturbation des microtubules et une dégénérescence des neurites dans les neurones de l'hippocampe qui peuvent être atténuées par l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'A $\beta$  ou de siRNA diminuant l'expression de la protéine Tau (De Felice et al. 2008; Jin et al. 2011). Ainsi, il semblerait que le développement de la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer et des déficits cognitifs qui y sont associés reposent sur une coopération entre les protéines A $\beta$  et Tau où l'A $\beta$  induirait des dysfonctionnements de la protéine Tau (phosphorylations, troncations et oligomérisation) conduisant à la dégénérescence neuronale. Ce sont les conséquences de ces modifications de la protéine Tau médiées par l'A $\beta$  qui vont nous intéresser dans la suite de cette partie.

L'accumulation de protéines et d'organites dans l'axone et le corps cellulaire se produit fréquemment dans les maladies neurodégénératives, suggérant un dysfonctionnement du transport axonal qui pourrait participer à la neurodégénérescence. Du fait du rôle de Tau dans le transport axonal, on peut se demander si ces perturbations sont médiées par cette dernière. De nombreuses études ont mis en évidence, dans les neurones contenant des DNFs, un transport antérograde fortement altéré le long des axones et des dendrites basales, et un transport rétrograde perturbé au niveau des dendrites apicales (pour revues voir De Vos et al., 2008 et Millicamps & Julien, 2013). Des travaux réalisés sur l'axoplasme de calamar ont montré que la perfusion de monomères de protéine Tau recombinante humaine n'a aucun effet sur le transport antérograde ou rétrograde alors que la perfusion de formes toxiques agrégées inhibe le transport axonal rapide de manière dépendante de l'activité de GSK-3 $\beta$  et de PP1 (LaPointe et al. 2009; Kanaan et al. 2011). Cette perturbation du transport axonal est inhibée par la phosphorylation de Tau sur la tyrosine 18 (Kanaan et al. 2012). La protéine Tau hyperphosphorylée sur différentes sérines et thréonines peut interagir avec JIP1 (c-Jun N-terminal kinase- interacting protein 1), une protéine impliquée dans la liaison des cargos aux kinésines, entravant ainsi la formation du complexe kinésine ce qui pourrait participer à la perturbation du transport axonal présent dans la maladie d'Alzheimer (Ittner, Ke, et Götz 2009). L'implication de Tau dans ces altérations a également été montrée dans une étude sur des neurones en culture traités avec des oligomères d'A $\beta$  humains (Vossel et al. 2010). Ce groupe de chercheurs a observé une inhibition du transport axonal des mitochondries et du récepteur aux neurotrophines TrkA suite à ce traitement, une inhibition qui a pu être

empêchée par la diminution, partielle ou totale, de l'expression de Tau. Ces données indiquent donc une implication de Tau dans les défauts de transport axonal médiés par les A $\beta$ o. La protéine Tau affecterait ce transport axonal en perturbant la structure des microtubules. En effet, l'utilisation d'un stabilisateur des microtubules, l'épothilone D, chez des souris transgéniques présentant une tauopathie améliore le transport axonal et les performances cognitives (B. Zhang et al. 2012).

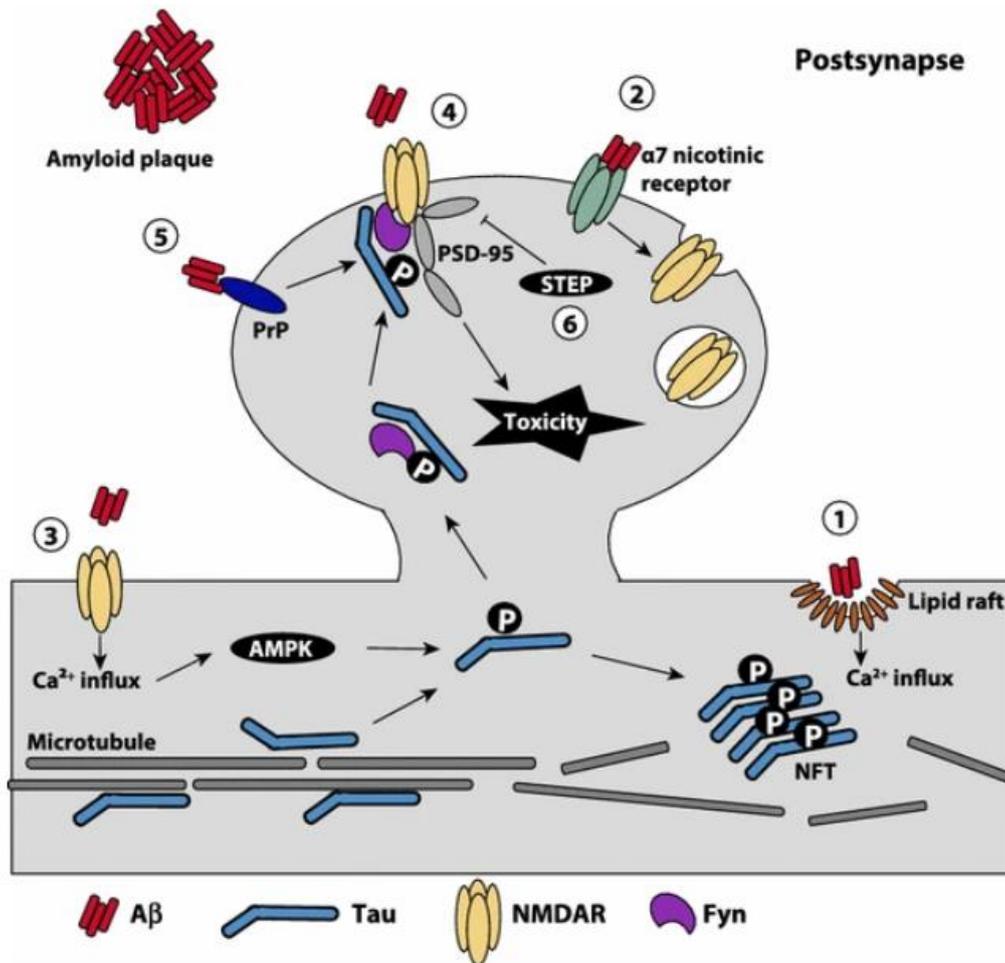
L'étude de cerveaux de patients Alzheimer a mis en évidence la présence de PHFs dans le noyau des neurones (Metuzals et al. 1988). Ainsi, en plus de perturber le transport axonal, les modifications pathologiques de la protéine Tau entraîneraient des dysfonctions nucléaires. Plusieurs travaux ont montré que l'hyperphosphorylation pathologique de Tau diminue la translocation de Tau dans le noyau ainsi que sa capacité à lier et protéger l'ADN (Lefebvre et al. 2003; Y. Lu et al. 2013; Qi et al. 2015). De plus, dans un modèle de souris tauopathique, l'hyperthermie semble induire un stress oxydatif associé à l'oligomérisation de Tau conduisant à des cassures des brins d'ADN dans les neurones de l'hippocampe (Violet et al. 2015). Le prétraitement de ces souris avec un inhibiteur de l'oligomérisation de Tau avant l'induction de l'hyperthermie a permis de réduire les dommages de l'ADN montrant ainsi l'implication de l'oligomérisation de Tau dans la perturbation de ses fonctions de protection de l'ADN. Ces données suggèrent une perte de fonction de la protéine Tau au niveau nucléaire favorisant les dommages de l'ADN par le stress oxydatif ce qui pourrait contribuer à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, on peut également observer un gain de fonction toxique de la protéine Tau hyperphosphorylée dans le noyau. Ces formes hyperphosphorylées pourraient s'associer aux granules de stress (complexes contenant de l'ARN et des protéines de liaison à l'ARN) ce qui perturberait la dynamique de ces granules, favorisant la sensibilité des cellules au stress et diminuant leur viabilité (Brunello, Yan, et Huttunen 2016). Une étude sur des souris transgéniques surexprimant la protéine Tau et sur le cerveau de patients Alzheimer a mis en évidence une interaction de Tau avec le pore nucléaire entraînant une perturbation du transport nucléocytoplasmique qui pourrait aussi induire une neurotoxicité (Eftekhazadeh et al. 2018). Dans la maladie d'Alzheimer, TDP-43 (transactive response DNA binding protein 43), un répresseur transcriptionnel, est associé à un volume hippocampique plus faible et des troubles cognitifs plus sévères (Josephs et al. 2015). Tomé et al., 2021 a montré que la protéine Tau interagit avec ce répresseur dans l'hippocampe de patients Alzheimer ce qui pourrait participer à la mort neuronale hippocampique et aux déficits cognitifs.

La protéine Tau peut également induire une toxicité au niveau dendritique par son interaction avec la katanine et la spastine, deux enzymes impliquées dans la dépolymérisation des microtubules. La présence de Tau au niveau axonal protège les microtubules de l'action de la katanine. En revanche, dans des neurones en culture, la relocalisation de Tau induite par les A $\beta$  dans le compartiment dendritique entraîne la translocation de la TLL6 (Tubulin-Tyrosine-Ligase-Like-6) dans ces dendrites. La TLL6 provoque ensuite la polyglutamylation des microtubules, augmentant leur susceptibilité au clivage par la spastine ce qui va conduire à une perte des épines et une perturbation du transport axonal (Zempel et al. 2013; Zempel et Mandelkow 2015). Ces effets délétères sur les microtubules et les synapses induits par la translocation de la TLL6 dans les dendrites et la polyglutamylation des microtubules sont absents dans les neurones de souris Tau KO traités avec des A $\beta$  humains. Lorsque la protéine Tau 2N4R humaine est introduite dans ces neurones de souris Tau KO, les effets toxiques des oligomères d'A $\beta$  sont rétablis montrant ainsi l'implication de la translocation de Tau au niveau dendritique dans les effets neurotoxiques induits par les A $\beta$ .

L'analyse *post mortem* de cerveaux de patients Alzheimer a mis en évidence la présence d'oligomères de Tau au niveau pré- et post-synaptique (Tai et al. 2012; Pickett et al. 2019; Colom-Cadena et al. 2023). En effet, des études ont montré une translocation de Tau dans les épines dendritiques dans des neurones hippocampiques d'un modèle de souris Alzheimer surproduisant l'A $\beta$ , dans des cultures de neurones hippocampiques de rat traitées avec des oligomères d'A $\beta$  ou dans des neurones corticaux en culture surexprimant la protéine Tau humaine et traités avec des A $\beta$  (Frandemiche et al. 2014; E. C. Miller et al. 2014). De plus, Tau phosphorylée et A $\beta$  colocalisent dans les synapses de cerveaux de patients Alzheimer (Fein et al. 2008) et dans le cerveau d'un modèle de souris Alzheimer (Takahashi et al. 2010). On peut donc envisager que l'hyperphosphorylation de Tau induite par A $\beta$  soit un évènement intermédiaire conduisant à un dysfonctionnement des synapses. Dans des neurones d'hippocampes de rats en culture, Hoover et al., 2010 ont montré qu'en surexprimant le mutant P301L de la protéine Tau humaine non phosphorylée ou pseudophosphorylée, seul le mutant pseudophosphorylé s'accumule dans les épines dendritiques entraînant une altération de l'expression des récepteurs AMPA et NMDA et une perturbation de la transmission synaptique. Conformément à ces résultats, la suppression de la protéine Tau (par l'utilisation d'un Tau KO) ou l'inhibition de sa phosphorylation à l'aide d'un inhibiteur de GSK-3 $\beta$  empêche les altérations de la LTP induites par l'A $\beta$  humain (Shipton et al. 2011). La tyrosine kinase Fyn semble jouer un rôle important dans le développement des dysfonctions

synaptiques induites par les protéines A $\beta$  et Tau. En effet, la surexpression de la protéine Fyn chez des souris transgéniques exprimant l'APP humaine exacerbe la synaptotoxicité et les troubles cognitifs observés dans ce modèle de souris (Chin et al. 2004, 2005). L'inactivation du gène codant pour la protéine Tau dans ces souris doublement transgéniques (APP humaine/Fyn) empêche la survenue de ces déficits synaptiques et comportementaux (Roberson et al. 2011). Des travaux ont mis en avant une voie de signalisation où Tau favorise la synaptotoxicité d'A $\beta$  dans un modèle de souris exprimant l'APP humaine en transportant la tyrosine kinase Fyn des dendrites vers les récepteurs NMDA post-synaptiques. Fyn va ensuite phosphoryler leur sous-unité NR2B ce qui va stabiliser l'interaction de ces récepteurs NMDA avec la PSD95, et faciliter l'excitotoxicité induite par l'A $\beta$  et le développement de troubles cognitifs (Nakazawa et al. 2001; Ittner et al. 2010). La phosphorylation de Tau favoriserait cette synaptotoxicité puisque la pseudophosphorylation de la protéine Tau renforce son interaction avec Fyn (Bhaskar, Yen, et Lee 2005). Tau peut également induire un dysfonctionnement synaptique via l'élément pré-synaptique. Ainsi, la micro-injection de Tau humaine dans la synapse géante de calamar entraîne une augmentation de la libération de calcium des stocks intracellulaires et une perturbation de la neurotransmission via un mécanisme impliquant les kinases GSK-3 $\beta$  et Cdk5 (Moreno et al. 2016). Une autre étude réalisée chez des souris transgéniques exprimant une forme mutée de Tau favorisant son agrégation a montré une dérégulation du calcium dans le bouton pré-synaptique ainsi qu'une déplétion des vésicules synaptiques dans les neurones de l'hippocampe (Decker et al. 2015).

Nous avons donc décrit différents mécanismes neuropathologiques par lesquels les protéines A $\beta$  et Tau coopèrent pour induire les dysfonctions neuronales observées dans la maladie d'Alzheimer et notamment la synaptotoxicité (**Figure 17**). Bien que cette pathologie neurodégénérative présente des lésions cérébrales et des troubles cognitifs relativement communs, de nombreux facteurs peuvent influencer la survenue de cette maladie. Nous allons donc maintenant nous intéresser aux facteurs génétiques et environnementaux favorisant son développement.



**Figure 17 : Mécanismes proposés sous-tendant l'interaction toxique entre Aβ et tau à la synapse (adaptée de Nisbet et al., 2015).** Les oligomères d'Aβ exercent leur toxicité au niveau de la synapse par différents mécanismes : **(1)** La liaison de l'Aβ à la membrane plasmique forme des pores dans la membrane, qui peuvent être facilités par les radeaux lipidiques, ce qui entraîne un afflux de calcium dans la cellule et l'activation en aval de kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine Tau. **(2)** L'Aβ médie indirectement l'internalisation des récepteurs NMDA synaptiques par sa liaison aux récepteurs nicotiques α7. Il en résulte une réduction des récepteurs NMDA au niveau de la synapse entraînant un rétrécissement et une rétraction de ces synapses. **(3)** L'Aβ peut médier l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques ce qui induit également un afflux de calcium dans le neurone et active à son tour des kinases telles que l'AMPK. Les kinases activées peuvent phosphoryler la protéine Tau dendritique entraînant la dissociation de la protéine Tau des microtubules et son agrégation en DNFs (NFT pour neurofibrillary tangles). La phosphorylation de Tau va également renforcer sa liaison à Fyn et conduire à la migration des protéines Tau et Fyn dans l'épine dendritique. **(4)** Dans l'épine, Fyn phosphoryle les récepteurs NMDA et, de ce fait, facilite leur interaction avec PSD-95, une interaction nécessaire à la toxicité de l'Aβ. **(5)** La liaison de l'Aβ à la PrPc peut également activer Fyn pour qu'elle phosphoryle les récepteurs NMDA. **(6)** Au fur et à mesure que la maladie progresse, l'Aβ peut activer la phosphatase STEP qui inactive Fyn ce qui entraîne la perte des synapses et l'effondrement des épines dendritiques.

## E. Formes familiales de la maladie d'Alzheimer et facteurs de risques

La maladie d'Alzheimer est une pathologie multifactorielle qui peut se diviser en deux catégories. On distingue les formes dites familiales de la maladie, en raison de mutations héréditaires sur certains gènes, et les formes dites sporadiques dont la survenue est influencée par des facteurs de risques génétiques et environnementaux.

### 1) Formes familiales

#### a. Mutations des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*

Les formes dites familiales de la maladie d'Alzheimer sont des formes autosomiques dominantes qui se caractérisent par la présence de mutations héréditaires situées sur les gènes *APP*, *PSEN1* ou *PSEN2* codant respectivement pour les protéines APP, PS1 et PS2. Elles représentent moins de 1% des cas et sont associées à une manifestation précoce et plus sévère des symptômes (Bekris et al. 2010). Pour rappel, les protéines APP, PS1 et PS2 sont toutes trois impliquées dans la production du peptide  $\beta$ -amyloïde et leurs mutations affectent la production, le métabolisme et l'agrégation d'A $\beta$  (Walsh et Selkoe 2007). Bien que la majorité de ces mutations soient considérées comme pathogènes, certaines d'entre elles ne présentent pas d'effets toxiques et peuvent même être protectrices. Dans une étude menée sur 1795 Islandais, Jonsson et al., 2012 ont identifié la mutation A673T (dite « Icelandic ») sur le gène de l'APP, qui protégerait ses porteurs contre la maladie d'Alzheimer et le déclin cognitif associé à l'âge. Cette mutation se situe près du site de clivage de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase réduisant ainsi ce clivage et la production de peptide A $\beta$  d'environ 40%. Récemment, une nouvelle mutation de l'APP a été rapportée chez des sujets Alzheimer d'origine chinoise, la mutation E674Q (dite « Shanghai ») également située proche du site de clivage par la  $\beta$ -sécrétase, favorisant la production du peptide A $\beta$  (Yongfang Zhang et al. 2024). Contrairement aux autres formes familiales de la maladie, cette mutation n'entraîne pas de développement précoce de la maladie avec l'apparition d'un déclin cognitif aux alentours de 70 ans. Il est intéressant de noter que le gène de l'APP se trouve sur le chromosome 21. Ainsi, chez les personnes atteintes du syndrome de Down, aussi appelé trisomie 21, on observe une prévalence de la maladie d'Alzheimer plus importante que dans la population générale avec un âge moyen d'apparition des symptômes autour de 54 ans (Castro, Zaman, et Holland 2017).

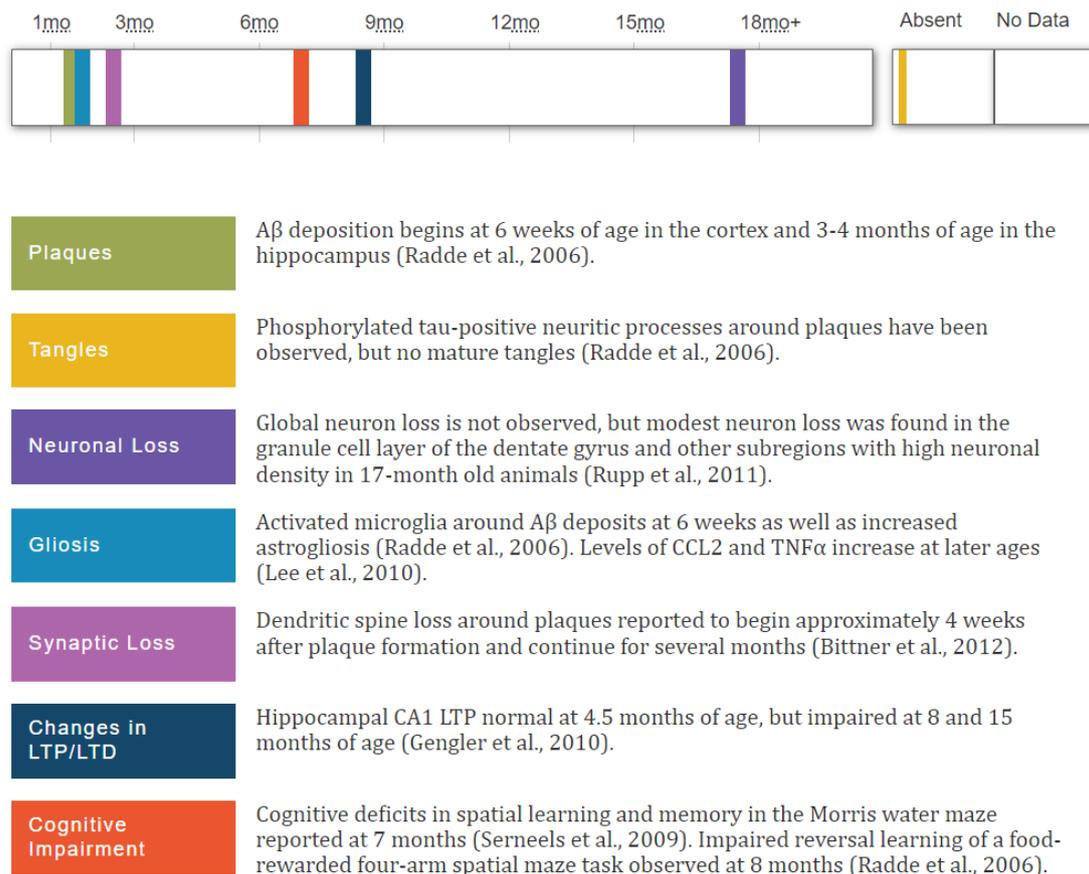
En revanche, bien que la maladie d'Alzheimer soit une tauopathie, aucune mutation de la protéine Tau n'a été rapportée (Reitz et Mayeux 2014).

### b. Modèles murins

La découverte de ces différentes mutations a permis le développement de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer permettant d'étudier et de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans son développement. Dans ce contexte, les modèles murins sont aujourd'hui largement utilisés. La plupart de ces modèles transgéniques sont dits humanisés. Ils sont générés par l'insertion de gènes humains dans le génome murin permettant ainsi la production de la forme humaine de la protéine (pour revue voir Esquerda-Canals et al., 2017). En effet, bien que l'A $\beta$  murin ne diffère de l'A $\beta$  humain que de trois acides aminés (R5G, Y10F et H13R), ces différences semblent suffisantes pour prévenir son agrégation et ses effets délétères. Les gènes humains insérés correspondent à ceux identifiés dans les formes familiales de la maladie, à savoir l'APP, PSEN1 et/ou PSEN2.

Dans cette présente étude, nous avons utilisé le modèle de souris APP/PS1-21, généré au sein du laboratoire du Professeur Jucker (Radde et al. 2006). Ce modèle contient deux transgènes humains : celui de l'APP contenant la mutation Swedish qui correspond à la double mutation K670N/M671L, et celui de la PS1 avec la mutation L166P. Ces transgènes sont sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1 (*thymocyte differentiation antigen 1*) permettant une expression constante dans le cerveau adulte qui débute aux alentours du 14<sup>ème</sup> jour post-natal, évitant ainsi les perturbations lors du développement embryonnaire (Porrero et al. 2010). Chez ces souris transgéniques, l'expression de l'APP humaine est trois fois plus importante que celle de l'APP murine. La mutation Swedish, localisée juste avant le site de clivage de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase, favorise ce clivage et conduit à une augmentation massive de la production d'A $\beta$  sans affecter le ratio A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  (Citron et al. 1992). La mutation L166P de la PS1, quant à elle, induit une réduction partielle de la fonction de la  $\gamma$ -sécrétase se traduisant par une diminution de la production d'A $\beta_{40}$  et une augmentation du ratio A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  (Koch et al. 2012). L'utilisation de ce modèle est donc pertinente dans le cadre d'études sur les effets synaptotoxiques de l'A $\beta_{42}$ . Ces différentes mutations ont pour conséquence l'apparition précoce des caractéristiques neuropathologiques associées à la maladie d'Alzheimer (**Figure 18**). Ce modèle transgénique présente notamment une hyperactivité des neurones de l'hippocampe à 1 mois suivie d'une hypoactivité à 3 mois (Bosson et al. 2017;

Paumier et al. 2022), une perte synaptique à 3 mois (Bittner et al. 2012), des déficits cognitifs à 7 mois (Radde et al. 2006; Serneels et al. 2009) ainsi que des dépôts amyloïdes qui apparaissent à 6 semaines dans le cortex et à 3 mois dans l'hippocampe (Radde et al. 2006). En revanche, ces souris ne présentent qu'une très faible mort neuronale, restreinte au niveau du gyrus dentelé et observable à un âge tardif (17 mois) (Rupp et al. 2011).



**Figure 18 : Caractérisation phénotypique du modèle murin APP/PS1-21 (source : Alzforum.org).**

Il est important de considérer que même si ces modèles transgéniques reproduisent certaines caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer, d'autres sont absentes. Notamment, très peu, voire aucune mort neuronale n'est observée dans la majorité de ces modèles alors que les troubles cognitifs surviennent relativement rapidement (Dennis J. Selkoe 2011). De plus, la plupart d'entre eux ne présentent pas de DNFs bien que l'on puisse, dans certains cas, retrouver une augmentation de la phosphorylation de Tau. C'est pourquoi, malgré qu'aucune mutation de la protéine Tau n'ait été rapportée dans la maladie d'Alzheimer, de nombreux modèles murins exprimant une forme mutée humaine du gène *MAPT* ont été générés et sont utilisés dans le cadre de la recherche sur la maladie d'Alzheimer.

On citera comme exemple le modèle triple transgénique appelé 3xTg, portant les mutations APP Swedish, M146V de la PS1 et P301L de Tau (Oddo et al. 2003). Ces souris transgéniques développent des plaques amyloïdes et des DNFs, et présentent des dysfonctions synaptiques et des troubles cognitifs. Ainsi, bien qu'imparfaits, ces modèles permettent d'étudier les effets d'une surproduction d'A $\beta$  dans un contexte tauopathique. Par ailleurs, les modèles amyloïdogéniques sont basés sur des mutations présentes au sein des formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Cependant, ce sont des formes agressives qui ne représentent qu'une faible proportion des cas observés dans la population. C'est pourquoi la recherche s'attèle à développer de nouveaux modèles se rapprochant des formes sporadiques de la maladie (Reagan et al. 2022). Par exemple, un modèle de souris knock-in a été généré, exprimant l'A $\beta$  WT humain sous contrôle du locus *App* murin (Baglietto-Vargas et al. 2021). Ce modèle présente entre autres des déficiences cognitives et de plasticité synaptique, une diminution du volume de l'hippocampe ou encore des altérations inflammatoires. Une augmentation des formes insolubles de l'A $\beta$  et une diminution des formes solubles avec l'âge ont également été détectées, reproduisant ainsi ce que l'on observe chez les sujets Alzheimer. En revanche, aucune plaque amyloïde et mort neuronale n'ont été identifiées. Bien que la plupart des modèles développés présentent les principales caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer (plaques amyloïdes et/ou DNFs), beaucoup d'entre eux ne reproduisent pas la mort neuronale subséquente aux lésions de la pathologie (Oliver Wirths et Zampar 2020). Ainsi, malgré de nombreuses études et la découverte de nombreux mécanismes participant au développement de la maladie, ceux-ci ne sont pas encore entièrement compris. Récemment, une étude menée sur un modèle de souris transgénique développant une pathologie amyloïde a mis en évidence une différence de vulnérabilité à la maladie d'Alzheimer entre les neurones murins et humains (Balusu et al. 2023). En effet, ce groupe de chercheurs a réalisé des xénogreffes de neurones humains dans le cerveau de ce modèle de souris amyloïdogénique. Ils ont observé que seuls les neurones humains développaient une pathologie Alzheimer sévère avec l'apparition de DNFs et une importante mort neuronale. Ces travaux révèlent ainsi une vulnérabilité spécifique des neurones humains à la maladie d'Alzheimer qui pourrait expliquer l'absence de modèles animaux transgéniques capables de reproduire toutes les caractéristiques présentes chez les patients Alzheimer. De plus, cette étude met en lumière l'utilisation d'un nouveau modèle potentiellement plus adéquat pour la recherche sur la maladie d'Alzheimer et le développement de stratégies thérapeutiques.

Nous avons donc discuté des formes familiales de la maladie d'Alzheimer et des modèles transgéniques développés pour l'étudier. Cependant, dans la plupart des cas, la survenue de cette pathologie n'est pas due à des mutations héréditaires identifiées mais est influencée par des facteurs de risques génétiques et environnementaux.

## 2) Formes sporadiques

Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer constituent la grande majorité des cas et sont considérées comme multifactorielles du fait de la diversité des facteurs de risques environnementaux et génétiques influençant leur développement (Reitz et Mayeux 2014). La maladie d'Alzheimer étant une maladie du vieillissement, le principal facteur de risque est l'âge avec une apparition des symptômes en moyenne autour de 65 ans. Cet âge permet de différencier deux catégories de patients : les patients présentant une maladie d'Alzheimer avant 65 ans, dite à début précoce (EAOD pour early-onset Alzheimer's disease), qui correspond en grande partie aux formes familiales de la maladie, et les patients présentant une maladie d'Alzheimer après 65 ans, dite à début tardif (LOAD pour late-onset Alzheimer's disease) et qui correspond pour la majorité aux formes sporadiques de la maladie.

### a. Facteurs de risques environnementaux

De nombreux facteurs de risques environnementaux ont été identifiés et associés au développement de la maladie d'Alzheimer. L'hygiène de vie semble être un facteur prépondérant dans l'apparition et l'évolution de la maladie. En effet, une mauvaise alimentation peut entraîner des troubles du métabolisme tels que l'obésité ou le diabète. Ces syndromes peuvent s'accompagner d'un syndrome inflammatoire chronique et augmenter l'incidence de la maladie d'Alzheimer (Cummings et al. 2022; Flores-Cordero et al. 2022). De même, l'hypertension (Lennon, Koncz, et Sachdev 2021), la consommation de certains médicaments comme les benzodiazépines (Biétry et al. 2017), ou encore la consommation d'alcool (Chandrashekar et al. 2023) sont également des facteurs de risques associés à la maladie d'Alzheimer. L'exposition à des polluants environnementaux comme les pesticides ou certains métaux neurotoxiques tels que le plomb ou le mercure peut conduire à une augmentation de la production d'A $\beta$  et de la phosphorylation de Tau et constitue donc un facteur de risque (Chin-Chan, Navarro-Yepes, et Quintanilla-Vega 2015). Suite à la pandémie

mondiale, des études ont été réalisées sur les conséquences neurologiques d'une infection au COVID-19 et ont identifié ce virus comme facteur de risque (Golzari-Sorkheh, Weaver, et Reed 2023). En effet, plus de 25% des patients ont rapporté des symptômes neurologiques comme des pertes de mémoire et des maux de tête. Ces symptômes peuvent être dus à la pénétration du virus dans le système nerveux central et/ou à la neuroinflammation qui en résulte, neuroinflammation qui peut contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer. En revanche, une bonne hygiène de vie associée à une activité physique régulière et des activités intellectuelles et sociales constitueraient des facteurs protecteurs de la maladie (Fratiglioni, Paillard-Borg, et Winblad 2004; Iso-Markku et al. 2022).

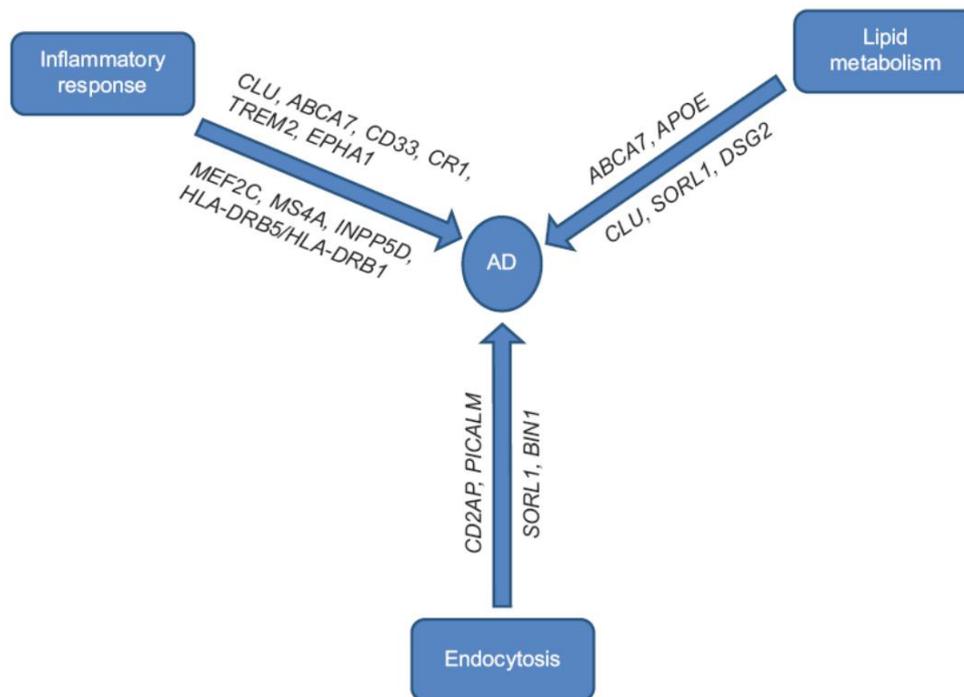
L'étiologie de la maladie d'Alzheimer semble donc complexe du fait de la multitude de facteurs pouvant influencer son apparition et son développement. Cependant, outre ces facteurs environnementaux, des facteurs génétiques ont été associés à la maladie.

#### b. Facteurs de risques génétiques

De nombreux gènes ont été identifiés comme favorisant le développement de la maladie d'Alzheimer. Dans les formes sporadiques, les facteurs génétiques représentent 60 à 80% des risques (Gatz et al. 2006). Le principal facteur de risque génétique est le gène *APOE* codant pour la protéine Apolipoprotéine E (ApoE), impliquée dans le transport lipidique (Strittmatter et al. 1993). Ce gène se situe sur le chromosome 19 et possède trois variations alléliques chez l'Homme :  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ . La prévalence de ces allèles dans la population générale est respectivement d'environ 7-8%, 75-80% et 14-15% (Schipper 2011). La présence d'un allèle  $\epsilon 4$  augmenterait de 2 à 3 fois le risque de développer la maladie d'Alzheimer, et il augmenterait de 12 fois pour les porteurs des deux allèles (Mahoney-Sanchez et al. 2016). Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, des données cliniques et précliniques suggèrent que cet allèle  $\epsilon 4$  constitue un facteur de risque en favorisant l'apparition précoce et abondante des dépôts amyloïdes via l'inhibition de la clairance de l'A $\beta$  et l'accélération de son agrégation (Y. Yamazaki et al. 2019). A l'inverse, l'allèle  $\epsilon 2$  aurait un effet neuroprotecteur (Corder et al. 1994).

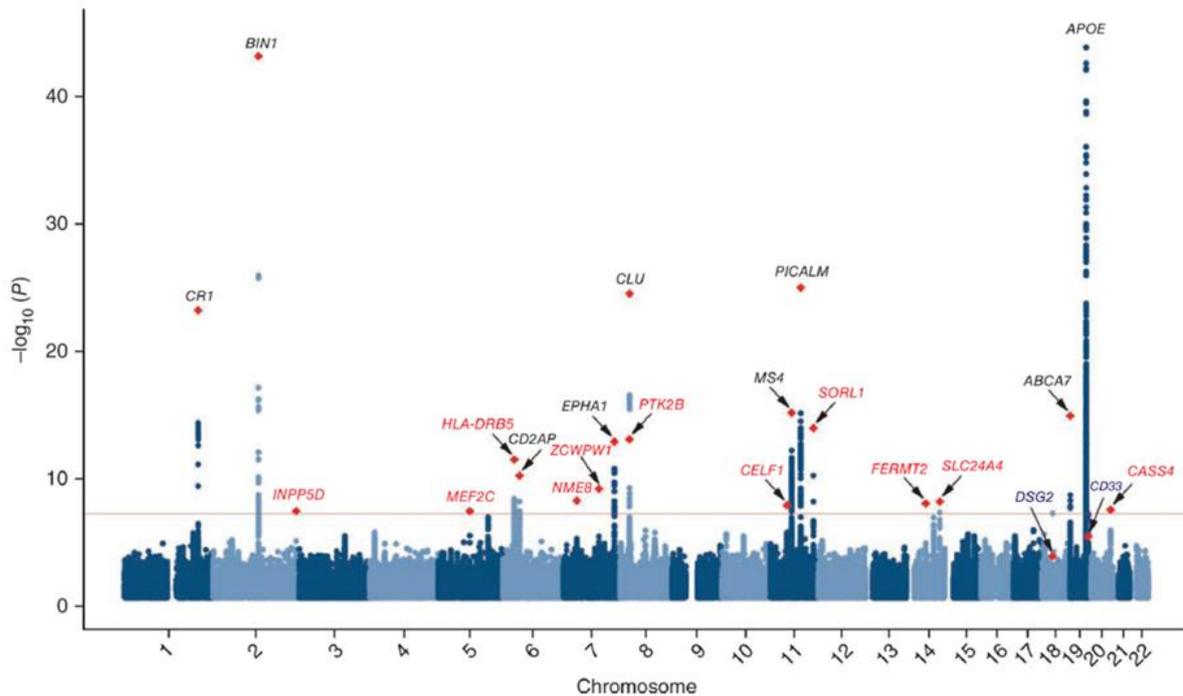
Des études d'association pangénomiques ont permis d'identifier d'autres facteurs de risques génétiques associés au développement de la maladie d'Alzheimer. La majorité de ces gènes identifiés pourraient être liés aux pathologies A $\beta$  ou Tau via trois voies de signalisation :

la réponse inflammatoire, le métabolisme des lipides et l'endocytose (**Figure 19**) (Giri, Lü, et Zhang 2016).



**Figure 19** : Principales voies de signalisation impliquées dans la maladie d'Alzheimer et les gènes affectés (adaptée de Giri et al., 2016). AD = Alzheimer's disease.

En 2013, une méta-analyse d'études d'association pangénomiques comprenant 17 008 cas de LOAD et 37 154 témoins a identifié 11 nouveaux gènes comme associés à la maladie (**Figure 20**) (European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013).



**Figure 20 : Manhattan plot de l'association pangénomique avec la maladie d'Alzheimer (17 008 cas et 37 154 témoins) (adaptée de European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al., 2013).** Le seuil de significativité ( $p < 5.10^{-8}$ ) est indiqué par la ligne rouge. Les gènes précédemment identifiés par des études pangénomiques sont affichés en noir et les gènes nouvellement associés à la maladie d'Alzheimer sont affichés en rouge. Les losanges rouges représentent les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP pour single nucleotide polymorphism) avec les plus petites p-valeur dans l'analyse globale.

Parmi ces nouveaux gènes identifiés, le gène *PTK2B* était l'un des plus significatifs. Il code pour la protéine Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) qui sera au centre de ce présent manuscrit. Dans la prochaine partie de cette introduction, nous allons donc nous intéresser à cette protéine et son implication dans la maladie d'Alzheimer.

## II. La tyrosine kinase Pyk2

### A. Origine et structure

#### 1) Famille FAK (focal adhesion kinase)

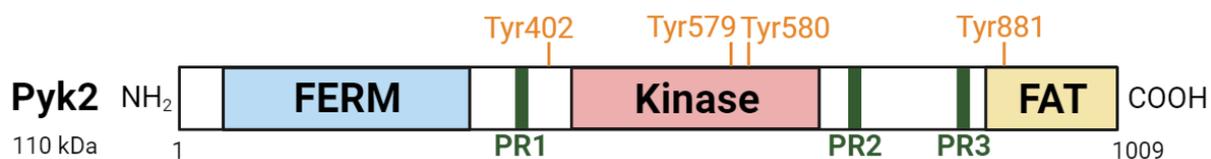
Pyk2 est une tyrosine kinase non-récepteur codée par le gène *PTK2B*, situé respectivement sur les chromosomes 8 et 14 chez l'Homme et la souris (Fiedorek et Kay 1995; Herzog et al. 1996). C'est une protéine hautement conservée entre les espèces puisque sa

séquence en acides aminés présente 95% d'homologie entre l'Homme et la souris (Avraham et al. 1995). Elle fait partie de la famille des kinases de l'adhésion focale (FAK) qui se compose de Pyk2 et de la protéine FAK. Ces tyrosines kinases partagent environ 45% d'identité de séquence en acides aminés et 65% de similarité (Avraham et al. 1995; Sasaki et al. 1995). La protéine FAK a été la première identifiée, dans le début des années 1990, et a donc donné son nom à cette famille de kinases (Guan, Trevithick, et Hynes 1991; Hanks et al. 1992; Schaller et al. 1992). Pyk2 a été découverte indépendamment dans plusieurs laboratoires et dans différents modèles cellulaires. Ainsi, elle est aussi connue sous le nom de fakB (Kanner, Aruffo, et Chan 1994), cell adhesion kinase- $\beta$  (CAK $\beta$ ) (Sasaki et al. 1995), related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) (Avraham et al. 1995), ou encore calcium-dependent protein-tyrosine kinase (CADTK) (H. Yu et al. 1996).

## 2) Structure

### a. Domaines de Pyk2

Pyk2 est une protéine de 1009 acides aminés et 110 kDa comprenant plusieurs domaines structurellement bien définis : un domaine 4.1/ezrin/radixin/moesin (FERM) N-terminal, un domaine kinase central et un domaine focal adhesion targeting (FAT) C-terminal (Hildebrand, Schaller, et Parsons 1993; Chishti et al. 1998; J. A. Girault et al. 1998; J.-A. Girault et al. 1999) (**Figure 21**). Entre les domaines FERM et kinase, se trouve une région contenant le domaine riche en proline 1 (PR1) ainsi que le site d'autophosphorylation Tyr402 de Pyk2. La région se situant entre les domaines kinase et FAT (KFL pour kinase-FAT linker) contient, quant à elle, deux domaines riches en proline PR2 et PR3. Ces différents domaines contribuent à la régulation de l'activité enzymatique de Pyk2 et à son interaction avec de nombreuses protéines permettant ainsi la transduction du signal dans diverses cascades de signalisation. Contrairement à d'autres tyrosines kinases non-récepteurs, Pyk2 (tout comme FAK) ne contient aucun domaine SH2 et SH3 (Src-homology domain).



**Figure 21 : Structure schématique de Pyk2.** Pyk2 est une protéine de 1009 acides aminés et 110 kDa contenant, de l'extrémité N-terminale (NH<sub>2</sub>) à C-terminale (COOH), un domaine FERM, un domaine kinase et un domaine FAT. Elle contient également trois régions riches en proline (PR1 à 3) et des sites de phosphorylation (Tyr pour tyrosine).

Le domaine FERM permet à un certain nombre de protéines d'interagir avec les régions cytoplasmiques de protéines transmembranaires mais peut également faire le lien entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique (Chishti et al. 1998; J.-A. Girault et al. 1999). Ces interactions intermoléculaires sont modulées par des interactions intramoléculaires du domaine FERM capables de masquer certains sites de liaison pour des protéines partenaires notamment l'actine filamentaire (Gary et Bretscher 1995; Pearson et al. 2000). L'interaction du domaine FERM avec le PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) favorise l'interaction protéine-protéine via la fixation de l'IP<sub>3</sub> (inositol-(1,4,5)-trisphosphate) sur le domaine FERM entraînant un changement conformationnel de ce dernier et libérant ainsi ses sites de liaison (Hirao et al. 1996; Hamada et al. 2000). Le domaine FERM peut également interagir avec des protéines cytosoliques et nucléaires. Par exemple, Pyk2 peut interagir avec MAP4K4 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4) ce qui favoriserait la migration cellulaire des gliomes (Loftus et al. 2013). Ce domaine FERM contient une séquence NES (nuclear export signal) et NLS (nuclar localization sequence) permettant le transport nucléocytoplasmique de Pyk2 (S.-T. Lim et al. 2008; Ossovskaya et al. 2008). Au niveau nucléaire, Pyk2 interagit avec p53, un facteur de transcription régulant de multiples fonctions cellulaires comme le cycle cellulaire, l'autophagie ou encore l'apoptose, favorisant ainsi la croissance et la survie cellulaire (S.-T. Lim et al. 2010). Outre ces fonctions d'interaction avec d'autres protéines, le domaine FERM joue également un rôle d'autorégulation via son interaction avec le domaine kinase de Pyk2, inhibant ainsi son activité (Riggs et al. 2011; Loving et Underbakke 2019).

La région centrale de Pyk2 contient le domaine kinase constitué d'un site catalytique permettant la fixation de l'ATP, véritable siège de son activité kinase (Han et al. 2009), ainsi que deux sites de phosphorylation, les tyrosines 579 et 580, dont la phosphorylation est essentielle pour maximiser l'activité kinase de Pyk2.

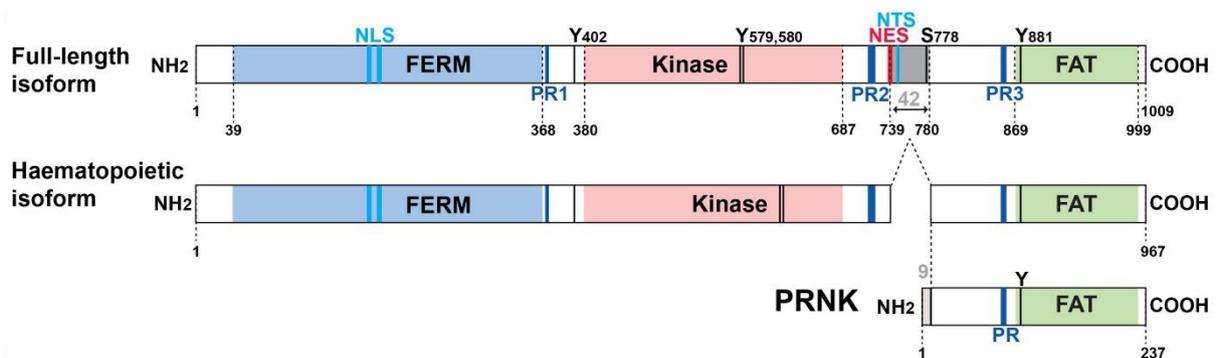
Sur l'extrémité C-terminale, se trouve le domaine FAT. Dans la protéine FAK, ce domaine est fortement impliqué dans les adhérences focales, notamment via la paxilline, une protéine d'échafaudage participant à l'adhésion cellulaire (Y. Shen et Schaller 1999). En revanche, l'interaction de Pyk2 avec cette protéine semble dynamique et instable ce qui pourrait expliquer qu'une faible proportion de Pyk2 soit localisée au niveau des contacts focaux dans la plupart des types cellulaires (Lulo, Yuzawa, et Schlessinger 2009; Vanarotti et al. 2014). Ce domaine FAT de Pyk2 montre une affinité préférentielle pour un autre membre de la famille de la paxilline, la leupaxine, dont l'interaction module la migration, l'adhésion et la motilité cellulaire dans le cancer de la prostate (Sahu et al. 2007; Vanarotti et al. 2016). De plus, le domaine FAT de Pyk2 s'associe à la gelsoline, une protéine se liant à l'actine, permettant à Pyk2 de réguler l'organisation du cytosquelette d'actine dans les ostéoclastes (Q. Wang et al. 2003). Ce domaine contient également la tyrosine 881, dont la phosphorylation par la protéine Src constitue un site de fixation pour la protéine adaptatrice Grb2 conduisant à l'initiation de voies de signalisation des MAPKs (Schlaepfer et Hunter 1996; Blaukat et al. 1999).

Entre ces différents domaines, on trouve différentes régions contenant des domaines riches en proline. La première région entre les domaines FERM et kinase présente le domaine PR1 et la tyrosine 402, dont la phosphorylation permet l'activation de Pyk2 (X. Li et al. 1999). La région KFL comprend les domaines PR2 et PR3 qui permettent l'interaction de Pyk2 avec le domaine SH3 d'autres protéines telles que PSD95 et SAP102 (synapse-associated protein 102) au niveau post-synaptique (Seabold et al. 2003). Cette même région contient également deux séquences, NES et NTS (nuclear targeting sequence) permettant le transport cytonucléaire de Pyk2 (Faure, Ramos, et Girault 2013).

### b. Isoformes

En plus de sa forme principale complète, Pyk2 présente deux isoformes provenant de l'épissage alternatif de son ARNm ou de sites alternatifs d'initiation de la transcription (**Figure 22**). La première isoforme est un variant alternatif fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques dont il manque un exon codant pour 42 acides aminés (739 à 780 chez le rat) entre les domaines PR2 et PR3 (Dikic, Dikic, et Schlessinger 1998; Keogh, Houliston, et Wheeler-Jones 2002; W. C. Xiong, Macklem, et Parsons 1998; Kacena et al. 2012). La seconde isoforme, probablement transcrite à partir d'un site d'initiation interne, ne possède ni le

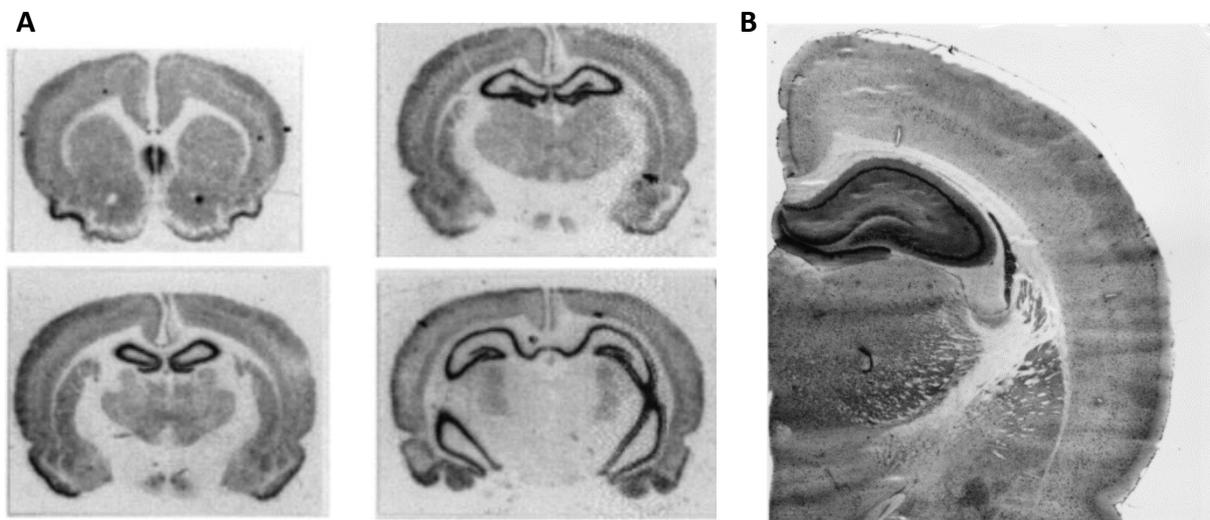
domaine FERM, ni le domaine kinase et est appelée PRNK (Pyk2-related non-kinase) (W. C. Xiong, Macklem, et Parsons 1998). Elle se compose du domaine C-terminal de Pyk2 fusionné à 9 acides aminés uniques, qui ne sont pas présents dans la forme complète de Pyk2. Cette isoforme est exprimée dans de nombreux types cellulaires, dont le cerveau, et pourrait agir comme un régulateur endogène de Pyk2 en inhibant son activité. Il a notamment été montré que l'injection de virus contenant le gène codant pour l'isoforme PRNK dans la veine caudale de rats atteints de fibrose cardiaque entraînait l'inhibition de la phosphorylation de Pyk2 et une réduction de cette fibrose (You et al. 2015). De même, la transfection d'une lignée cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou avec PRNK diminue l'adhésion, la migration, l'invasion et la viabilité des cellules tumorales et induit leur apoptose (Yue et al. 2015).



**Figure 23 : Représentation schématique des isoformes de la protéine Pyk2 (adaptée de de Pins et al., 2021).** Les limites des domaines structuraux sont indiquées avec le premier et le dernier résidu (numérotation de Pyk2 de souris) : FERM (4.1/ezrin/radixin/moesin), kinase, et FAT (focal adhesion targeting). Une isoforme de la protéine Pyk2 observée dans les cellules de la lignée hématopoïétique résulte d'un épissage alternatif avec l'absence d'un exon codant pour 42 acides aminés (encadré gris). PRNK (Pyk2-related non-kinase) est une isoforme courte qui dérive de l'initiation de la transcription au niveau d'un promoteur interne et comprend la région C-terminale de Pyk2 avec 9 résidus supplémentaires à son extrémité N-terminale qui ne sont pas présents dans Pyk2. D'autres sites importants sont indiqués dont les principaux sites de phosphorylation caractérisés (T : thréonine, Y : tyrosine), les motifs riches en proline (PR), la séquence de localisation nucléaire (NLS), le signal d'export nucléaire (NES) et la séquence de ciblage nucléaire (NTS).

## B. Expression et localisation cellulaire

Chez l'Homme comme chez le rongeur, Pyk2 n'est exprimée que très faiblement au niveau foetal. Chez l'adulte, Pyk2 s'exprime majoritairement dans le cerveau et les cellules hématopoïétiques mais également dans les poumons, le rein ou encore le thymus (Avraham et al. 1995; Menegon et al. 1999). Dans le système nerveux central, Pyk2 est fortement exprimée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et, dans une moindre mesure, dans le cortex, le striatum, l'amygdale et le thalamus (**Figure 23**). Bien que principalement exprimée dans les neurones, Pyk2 est également présente dans les astrocytes et les cellules microgliales (Tian, Litvak, et Lev 2000; Giralt, Coura, et Girault 2016).



**Figure 23 : Expression protéique et des ARNm de Pyk2 dans le cerveau de rat adulte (adaptée de Menegon et al., 1999). A) Hybridation *in situ* montrant la distribution des ARNm de Pyk2 dans des coupes coronales à différents niveaux d'un cerveau de rat adulte. B) Immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la protéine Pyk2 sur une coupe coronale d'un cerveau de rat adulte montrant une forte expression hippocampique.**

Dans les cellules non-neuronales, Pyk2 est essentiellement localisée dans la région périnucléaire mais peut également se trouver, en plus faible proportion, au niveau des contacts focaux (Sieg et al. 1998; Du et al. 2001). Dans les neurones, Pyk2 est enrichie dans le corps cellulaire et les dendrites (Menegon et al. 1999; Corvol et al. 2005). Pyk2 a aussi été observée dans le noyau de nombreux types cellulaires dont les neurones (Arcucci, Montagnani, et Gionti 2006; Faure et al. 2007; Schindler et al. 2007).

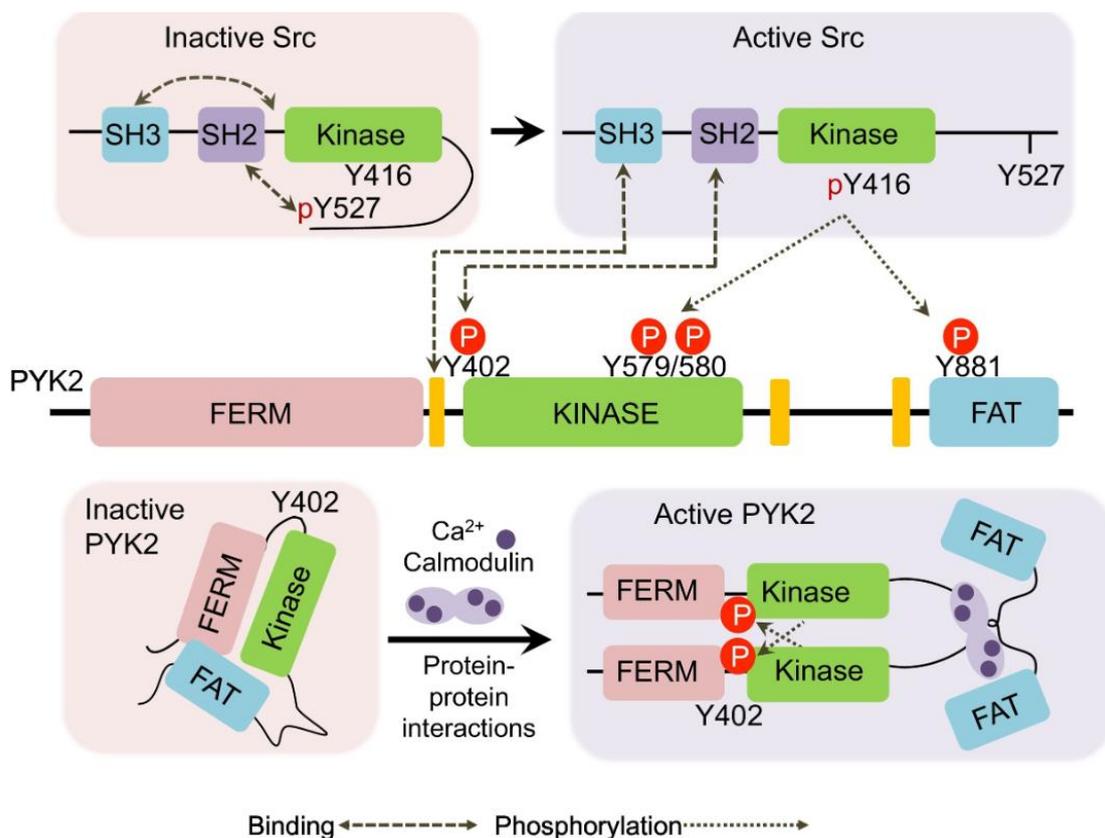
## C. Régulation de l'activité de Pyk2

### 1) Mécanismes d'activation

Pyk2 a été initialement décrite comme une tyrosine kinase dont l'activation dépend d'une élévation des concentrations de calcium intracellulaire (Lev et al. 1995). Bien que les mécanismes par lesquels ces augmentations de calcium intracellulaire activent Pyk2 ne sont pas encore totalement compris, il semblerait que la calmoduline (CaM) joue un rôle important dans ce processus (**Figure 24**). En effet, Kohno et al., 2008 a mis en évidence la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  au domaine FERM de Pyk2 conduisant à la formation d'homodimères et à son autophosphorylation sur la tyrosine 402. Cette dernière repose sur une réaction intermoléculaire entre deux protéines Pyk2 : on parle de trans-autophosphorylation (Park, Avraham, et Avraham 2004). Comme mentionné précédemment, ce domaine FERM exerce une action auto-inhibitrice de Pyk2 via une interaction intramoléculaire avec le domaine kinase, masquant ainsi le site de fixation de l'ATP (Loving et Underbakke 2019). De plus, le domaine FERM empêche la dimérisation de Pyk2 et donc sa trans-autophosphorylation, des éléments clés pour l'activation de cette tyrosine kinase (Riggs et al. 2011). Ainsi, l'interaction du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  avec le domaine FERM libère la protéine Pyk2 permettant sa dimérisation et sa trans-autophosphorylation. D'autres sites de fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ont été identifiés, l'un dans le domaine kinase et l'autre dans la région KFL de Pyk2, favorisant sa dimérisation (Xie et al. 2008; Momin et al. 2022). Cette dernière région pourrait également se lier aux domaines FERM-kinase, participant ainsi à l'auto-inhibition de Pyk2. Cependant, les mécanismes moléculaires initiés par la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  sur ces sites et conduisant à la trans-autophosphorylation de Pyk2 restent à élucider.

Cette trans-autophosphorylation va permettre le recrutement et l'interaction de Pyk2 avec les kinases de la famille Src (SFKs pour Src-family kinases) via la liaison de la Tyr402 phosphorylée avec le domaine SH2 des SFKs (X. Li et al. 1999). Parmi les SFKs interagissant avec Pyk2, on trouve Src et Fyn (Lakkakorpi et al. 2003; C. Li et Götz 2018), toutes deux fortement exprimées dans les neurones, ainsi que Lck (Ramesh K. Ganju et al. 1997), Lyn (Yamasaki et al. 2001) ou encore Yes (Sancho, Nuche-Berenguer, et Jensen 2012). Du fait de la conservation de la séquence du domaine PR1 entre les protéines FAK et Pyk2, il est probable que les SFKs puissent se lier à ce domaine PR1 via leur domaine SH3, comme c'est le cas pour FAK (Thomas et al. 1998). Suite à leur recrutement, ces SFKs vont phosphoryler différents

résidus de Pyk2, notamment les tyrosines 579 et 580 au sein de la boucle d'activation du domaine kinase, augmentant ainsi son activité kinase (X. Li et al. 1999; Park, Avraham, et Avraham 2004). Récemment, une étude a mis en évidence un changement de conformation de Pyk2 lorsque la boucle d'activation de Pyk2 est phosphorylée, permettant la stabilisation des motifs catalytiques de Pyk2 et empêchant sa conformation auto-inhibitrice du domaine FERM (Palhano Zanela et al. 2023). Il apparaît donc que la phosphorylation de ces différents résidus tyrosine favorise l'activité kinase de Pyk2. En effet, la mutation de son site de trans-autophosphorylation (Y402F) et des tyrosines 579/580 entraîne respectivement une diminution de l'activité kinase d'environ 70 et 60% (X. Li et al. 1999). Les SFKs peuvent également phosphoryler Pyk2 sur sa Tyr881 ce qui recrute le complexe Grb2/Sos conduisant à l'activation de la voie de signalisation ERK (une kinase faisant partie des MAPKs) dans des lignées cellulaires (Blaukat et al. 1999). La phosphorylation de Pyk2 sur plusieurs résidus tyrosine, combinée à son interaction avec de multiples partenaires, déclenche diverses voies de signalisation en fonction du type cellulaire.



**Figure 24 : Mécanismes d'activation de Pyk2 (adaptée de Gil-Henn et al., 2023).** En l'absence de stimulus, Pyk2 est dans une conformation inactive fermée (en bas à gauche). Son activation résulte de la liaison du complexe  $Ca^{2+}/CaM$  pour lequel plusieurs sites potentiels ont été

identifiés, notamment dans le domaine FERM, le domaine kinase et la région KFL (comme indiqué ici pour plus de simplicité). La liaison de ce complexe  $Ca^{2+}/CaM$  facilite la dimérisation/regroupement de Pyk2 et supprime l'effet inhibiteur du domaine FERM, ce qui permet la trans-autophosphorylation intermoléculaire de Tyr402 (Y402). Src, en conformation repliée et inactive en raison de ses propres interactions intramoléculaires qui bloquent son domaine kinase (en haut à gauche), interagit avec Pyk2 suite à sa trans-autophosphorylation. Ainsi, Y402 phosphorylée de Pyk2 lie le domaine SH2 de Src, tandis que le domaine PR1 de Pyk2 interagit avec le domaine SH3 de Src. Ces interactions perturbent l'inhibition intramoléculaire de Src et l'activent. Src activée phosphoryle alors plusieurs résidus tyrosine, notamment Y579 et Y580 dans la boucle d'activation du domaine kinase de Pyk2, augmentant ainsi son activité catalytique, mais également Y881 dans le domaine FAT, qui se lie à d'autres protéines contenant un domaine SH2. Les SFKs, et éventuellement Pyk2, peuvent phosphoryler des protéines associées, y compris celles qui interagissent avec les motifs PR2 et PR3 par l'intermédiaire de leurs domaines SH3. Il peut en résulter la formation de complexes multiprotéiques et l'activation de diverses voies de signalisation. Les SFKs activées peuvent également contourner l'étape dépendante de la  $Ca^{2+}/CaM$  en phosphorylant directement Y402. Dans les deux cas, les interactions entre les SFKs et Pyk2 constituent une boucle d'activation positive.

Comme présenté ci-dessus, la phosphorylation de Pyk2 sur sa Tyr402 recrute les SFKs qui peuvent ensuite phosphoryler d'autres résidus de Pyk2. Cependant, il semblerait que les SFKs puissent également phosphoryler ces autres résidus indépendamment de Tyr402 ou même directement phosphoryler la tyrosine 402 de Pyk2 (X. Li et al. 1999; Higa-Nakamine et al. 2020). Ainsi, dans l'hippocampe, Fyn joue un rôle important dans la phosphorylation des tyrosines de Pyk2, notamment la Tyr402, qui est nettement réduite dans des conditions basales et en réponse à des stimuli chez les souris Fyn KO (Corvol et al. 2005). Bien qu'il ait été mis en évidence une trans-autophosphorylation de Pyk2 indépendamment des SFKs (Park, Avraham, et Avraham 2004), une étude a suggéré que la protéine Src est nécessaire pour initier la phosphorylation de Tyr402 et que cette forme pré-activée de Pyk2 pourrait ensuite trans-autophosphoryler une autre protéine Pyk2 (M. Zhao et al. 2016). De plus, dans certains types cellulaires, l'activation de Pyk2 semble indépendante de la calmoduline. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur de la calmoduline W7 dans des lymphocytes T cytotoxiques n'impacte pas la phosphorylation de Pyk2 induite par l'ionomycine, un antibiotique permettant l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Lysechko, Cheung, et Ostergaard 2010). Dans ces cellules, l'augmentation de calcium intracellulaire stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène qui, à leur tour, activent la voie de signalisation de la kinase ERK conduisant à la phosphorylation de Pyk2 via les SFKs.

Bien que les mécanismes d'activation de Pyk2 ne soient pas totalement élucidés, il existe clairement une boucle de rétrocontrôle positive entre Pyk2 et les SFKs impliquant leurs interactions activatrices réciproques. Cela peut favoriser leur activation en réponse à des stimuli mais rend la relation de cause à effet entre ces événements difficiles à analyser.

## 2) Mécanismes de régulation de l'activation de Pyk2

Dans les cellules, l'activation de Pyk2 est régulée par diverses kinases et phosphatases. En plus des SFKs dont nous avons parlé dans la partie précédente, plusieurs études ont montré l'implication de la protéine kinase C (PKC) dans l'activation de Pyk2. En effet, l'utilisation de différents inhibiteurs de la PKC sur des tranches d'hippocampes de rats bloque l'activation de Pyk2 induite par une dépolarisation (Siciliano et al. 1996; Corvol et al. 2005). De même, l'inhibition pharmacologique de la PKC par la staurosporine ou Ro31-8220 inhibe la phosphorylation des tyrosines de Pyk2 dans des thrombocytes humains (Ohmori et al. 1999). Cependant, le mécanisme d'activation de Pyk2 par la PKC n'a pas été identifié et pourrait résulter d'effets indirects tels que l'activation de Src (Cao et al. 2007). D'autres travaux ont identifié la CaMKII comme inductrice de la phosphorylation de Pyk2. L'inhibition de la CaMKII par l'inhibiteur pharmacologique KN-62 ou par l'utilisation de siRNA inhibe la phosphorylation des tyrosines de Pyk2 induite par la dépolarisation membranaire de cellules PC12 (Zwick et al. 1999; Banno et al. 2008). De la même manière, l'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre la CaMKII  $\delta 2$  dans des cultures de neurones hippocampiques ou contre la CaMKII  $\beta'$  dans des cellules gonadotropes en culture inhibe l'activation de Pyk2 induite par la GnRH (gonadotropin-releasing hormone) (Okitsu-Sakurayama et al. 2019).

L'activation de Pyk2 est également régulée par des phosphatases. Celles-ci sont divisées en deux groupes selon les résidus qu'elles déphosphorylent : les tyrosines phosphatases (PTP pour protein tyrosine phosphatase) et les sérines-thréonines phosphatases. Dans les cellules non-neuronales, plusieurs PTPs ont été identifiées telles que SHP-1 (S. Kumar et al. 1999; R. K. Ganju et al. 2000), SHP-2 (Tang et al. 2000; Halfter, Derbyshire, et Vaillancourt 2005) ou encore PTP-PEST (Davidson 2001; Lyons et al. 2001). Cette dernière, aussi connue sous le nom de PTPN12, interagit avec Pyk2 via son domaine proline en N-terminal (Gupta et al. 2003; Chellaiah et al. 2007). Dans les neurones, PTP $\alpha$  diminue la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2, directement ou en régulant les SFKs puisque cette PTP est également capable de les déphosphoryler (Le et al. 2006). Cependant,

la phosphatase qui semble jouer un rôle prédominant dans l'inactivation de Pyk2 est la STEP (striatal-enriched protein-tyrosine phosphatase), également appelée PTPN5, enrichie dans les populations neuronales exprimant Pyk2 (Fitzpatrick et Lombroso 2011; Lombroso et al. 2016). La STEP se lie à Pyk2 et déphosphoryle sa tyrosine 402 (Xu et al. 2012). Sa délétion génétique chez les souris STEP KO augmente la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2 dans l'hippocampe (Venkitaramani et al. 2011). Parmi les sérines-thréonines phosphatases régulant l'activation de Pyk2, on trouve la calcineurine, aussi connue sous le nom de PP2B, qui semble impliquée dans l'activation de Pyk2. L'inhibition de la calcineurine par la cyclosporine A dans des lignées cellulaires d'hépatoblastome humain conduit à une diminution de la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2 (Xia et al. 2006). De même, l'inhibition de la calcineurine dans des cellules PC12 empêche la trans-autophosphorylation de Pyk2 induite par la dépolarisation des cellules (Faure et al. 2007). Ce même groupe de chercheurs a identifié la sérine 778 de Pyk2 comme cible de la calcineurine, un résidu dont la phosphorylation par la PKA est impliquée dans l'export nucléaire de Pyk2 (Faure, Ramos, et Girault 2013). Ainsi, lors de la dépolarisation de cellules PC12 ou de tranches d'hippocampes de souris, la déphosphorylation de sa sérine 778 par la calcineurine conduit à une accumulation nucléaire de Pyk2.

D'autres facteurs activant Pyk2 ont été rapportés sans élucidation complète de leurs mécanismes d'action, notamment un choc hyperosmotique (Tokiwa et al. 1996), un pH acide (Shaoying Li et al. 2004), la S-nitrosylation (X.-L. Yan et al. 2015) ou encore la SUMOylation (Uzoma et al. 2018) mais leur pertinence dans les neurones n'est pas connue.

Dans cette partie, nous avons abordé différents mécanismes de régulation de l'activation de Pyk2. Malgré le fait que ceux-ci ne soient pas entièrement compris, ces différents travaux démontrent un rôle prépondérant, direct ou indirect, des kinases et phosphatases dépendantes du calcium dans la régulation de l'activation de Pyk2. Nous allons maintenant nous intéresser au rôle physiopathologique de Pyk2 dans les cellules.

#### D. Pyk2 dans les cellules non-neuronales

Bien que Pyk2 soit majoritairement exprimée dans le système nerveux central, elle est également présente dans divers types cellulaires. Avant de nous concentrer sur son rôle dans le cerveau, je vais brièvement vous présenter ses différentes fonctions cellulaires et leurs implications physiopathologiques.

## 1) Fonction cellulaire

Dans les cellules non-neuronales, Pyk2 exerce diverses fonctions cellulaires. Pyk2 possède un domaine FAT qui permet son ciblage à la membrane et aux adhérences focales. Dans les fibroblastes, la micro-injection de Pyk2 conduit à une réorganisation des adhérences focales et à l'arrondissement des cellules (Du et al. 2001). Sa délétion dans les macrophages entraîne un retard de formation de lamellipodes en réponse à une stimulation chimiokine et une incapacité à se détacher d'un substrat réduisant ainsi leur migration (Okigaki et al. 2003). Pyk2 est également capable de réguler la répulsion cellule-cellule en induisant le désassemblage des adhérences focales (Hashido et al. 2006). Ainsi, Pyk2 semble favoriser le renouvellement de ces adhérences dans les cellules, un processus qui pourrait impliquer l'activation de RhoA, une GTPase régulant la dynamique du cytosquelette d'actine (Y. Lim et al. 2008). En accord avec son rôle dans le renouvellement des adhérences focales, Pyk2 induit également la migration de différents types cellulaires dont les cellules musculaires lisses vasculaires (Soe et al. 2009) et de multiples cellules de l'immunité telles que les lymphocytes B et T cytotoxiques (Tse et al. 2012; Cheung et Ostergaard 2016), les monocytes et macrophages (Watson et al. 2001; Okigaki et al. 2003), ou encore les éosinophiles et les granulocytes neutrophiles (Allingham, van Buul, et Burridge 2007; Zhu et al. 2008). Ce rôle semble impliquer la réorganisation du cytosquelette d'actine par les GTPases de la famille Rho. En effet, des études ont montré que Pyk2 est capable d'activer les protéines RhoA et Rac, impliquées respectivement dans la formation de fibres de stress et de lamellipodes (Lawson et Ridley 2018), favorisant ainsi la formation de ces structures d'actine et la migration cellulaire (Ohtsu et al. 2005; Miao et al. 2016). Pyk2 semble donc avoir un rôle pro-migratoire en stimulant Rho et Rac. En revanche, la délétion de Pyk2 augmente la migration des ostéoblastes, montrant un rôle anti-migratoire de Pyk2 dans ces cellules (Eleniste et al. 2016).

D'autres études ont mis en avant un rôle de Pyk2 dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, Pyk2 favorise la prolifération des lymphocytes et des cellules prostatiques (Miyazaki et al. 1998; Picascia et al. 2002), ainsi que la différenciation des kératinocytes (Schindler et al. 2007). Cependant, Pyk2 est plus souvent associée à la dédifférenciation cellulaire. Elle peut notamment inhiber la différenciation des progéniteurs myéloïdes (Dylla et al. 2004) et des cellules ostéoprogénitrices (Posritong et al. 2018).

Pyk2 joue également un rôle dans la survie cellulaire. Selon le type cellulaire et les conditions environnementales, Pyk2 peut être pro- ou anti-apoptotique. Ainsi, Pyk2 semble

avoir un effet anti-apoptotique dans les cellules épithéliales de mammifères et les thymocytes (Benbernou, Muegge, et Durum 2000; A. D. Burdick et al. 2006) alors qu'elle est pro-apoptotique dans les fibroblastes, les ostéoblastes et les cardiomyocytes (W. Xiong et Parsons 1997; Melendez et al. 2004; Plotkin, Manolagas, et Bellido 2007). En revanche, il a été montré dans ce dernier type cellulaire que Pyk2 a un rôle anti-apoptotique après une lésion d'ischémie-reperfusion cardiaque (B. A. Miller et al. 2019).

## 2) Rôle physiopathologique

A travers ses différentes fonctions cellulaires, Pyk2 impacte différents systèmes cellulaires et tissulaires. Il a notamment été montré un rôle de Pyk2 dans la résorption osseuse via l'activation des fonctions des ostéoclastes et l'inhibition de l'activité des ostéoblastes (Lakkakorpi et al. 2003; Posritong et al. 2018). Pyk2 est également impliquée dans l'intégrité du système vasculaire en perturbant les adhérences cellulaires, augmentant ainsi la perméabilité des cellules endothéliales (Soni et al. 2017), et en bloquant l'activité vasodilatatrice de ces cellules (Matsui et al. 2007). Dans le rein, Pyk2 participe à l'homéostasie acido-basique en favorisant les sécrétions acides par les cellules rénales lors d'un phénomène d'acidose (Preisig 2007). Pyk2 est également nécessaire au processus de capacitation des spermatozoïdes puisque son inhibition diminue leur motilité, la réaction acrosomique ainsi que leur capacité à pénétrer l'ovule (Battistone et al. 2014; Brukman et al. 2019). De plus, Pyk2 participe à la régulation du système immunitaire. Comme mentionné précédemment, Pyk2 favorise la migration de nombreuses cellules de l'immunité. De plus, elle participe à la phagocytose (Owen, Thomas, et Bouton 2007) et induit la sécrétion de cytokines par les macrophages (Välimäki et al. 2013). Dans les macrophages et les neutrophiles, l'activité de Pyk2 induit la production de ROS et est nécessaire pour les réponses inflammatoires de ces cellules (T. Zhao et Bokoch 2005; C.-F. Lin et al. 2008).

Outre son rôle physiologique, Pyk2 est impliquée dans de nombreuses pathologies, notamment dans les maladies inflammatoires (Zhu et al. 2018), la leucémie lymphoïde chronique (Sbrana et al. 2023), l'hypertrophie rénale chez les personnes atteintes de diabète (Mariappan et al. 2014) ou encore l'ostéoporose (Posritong et al. 2019). Étant donné le rôle de Pyk2 dans la migration, la différenciation et la survie cellulaire, Pyk2 a rapidement été considérée comme un oncogène potentiel (T. Shen et Guo 2018). Elle induit la croissance tumorale dans un certain nombre de cancer, notamment le glioblastome (Yadav et al. 2023),

ou encore le cancer de la prostate (Picascia et al. 2002). Elle participe aussi à l'invasion tumorale dans le cancer colorectal (C. Huang et al. 2021), l'hépatocarcinome (Chen et al. 2023) et le cancer du sein (Twafray et al. 2023). Elle favorise la résistance médicamenteuse ou à la chimiothérapie des cellules tumorales, notamment dans l'adénocarcinome ductal pancréatique (Ko et al. 2022) et dans le myélome multiple (Muz et al. 2019). Enfin, elle induit la survie des cellules tumorales dans le cancer de l'ovaire (Bermudez et al. 2008) et dans l'adénocarcinome pulmonaire (L. Wei et al. 2004).

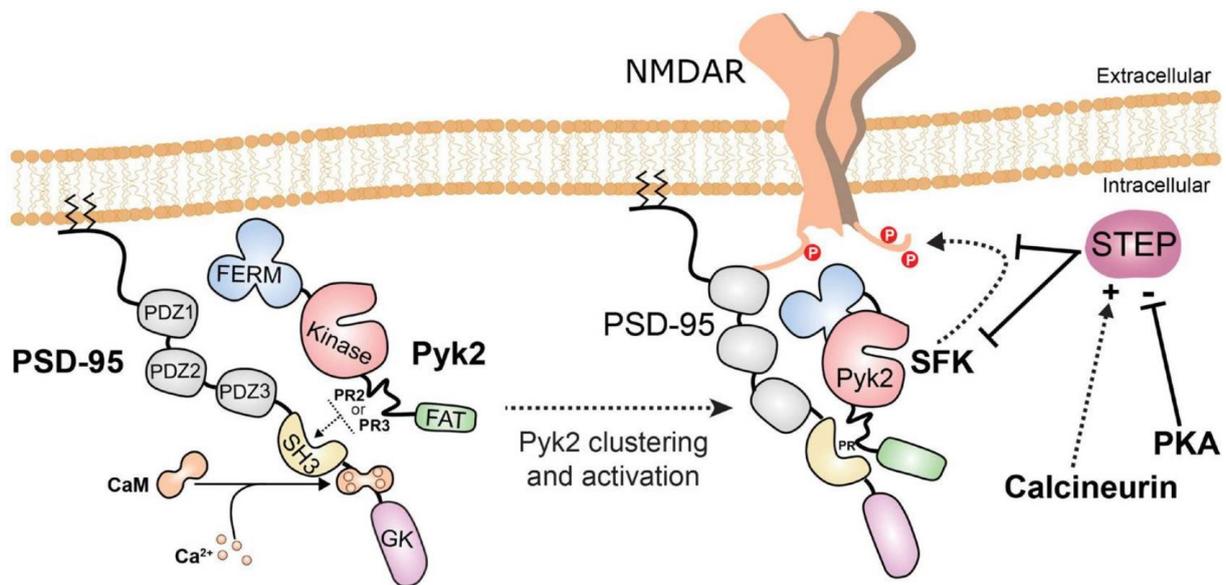
Je vous ai présenté différentes fonctions de Pyk2 dans les cellules non neuronales et leurs implications pathologiques. Nous allons maintenant nous concentrer sur le rôle de Pyk2 dans le cerveau.

## E. Pyk2 dans le système nerveux central

### 1) Activation spécifique de Pyk2 dans les neurones

Dans les neurones, en plus des mécanismes d'activation précédemment décrits, l'activation de Pyk2 peut être facilitée par son interaction avec PSD95 (**Figure 25**). En effet, Bartos et al., 2010 ont montré que l'influx de calcium dans les neurones stimule l'interaction de PSD95 avec Pyk2 permettant ainsi sa dimérisation et sa trans-autophosphorylation. Cette interaction s'effectue entre les domaines PR2 ou PR3 de Pyk2 et le domaine SH3 de PSD95 (Seabold et al. 2003). Cependant, en condition basale, le domaine guanylate kinase (GK) de PSD95 interagit avec son domaine SH3 empêchant ainsi son interaction avec Pyk2. Lors d'une augmentation de calcium intracellulaire, le complexe calcium/CaM s'associe avec la région SH3-GK de PSD95 ce qui libère son interaction auto-inhibitrice permettant son interaction avec Pyk2 (Bartos, Ulrich, Li, Beazely, Chen, Macdonald, et al. 2010). Ainsi, lors de la dépolarisation des neurones ou d'une activation des récepteurs NMDA par le glutamate, l'influx d'ions calcium à travers ces récepteurs induit le recrutement et le regroupement de Pyk2 au niveau post-synaptique via le complexe calcium/CaM/PSD95. Cela va permettre la trans-autophosphorylation de Pyk2 et son activation complète via les SFKs. Il a également été montré que la phosphorylation de PSD95 par les SFKs peut favoriser le recrutement et l'activation de Pyk2 dans la PSD (C. Zhao et al. 2015). En plus de PSD95, l'enrichissement post-synaptique de Pyk2 peut être facilitée par son interaction avec d'autres protéines de la PSD telles que SAP102 (Seabold et al. 2003) et SAPAP3 (SAP90/PSD-95-Associated Protein-3)

(Bongiorno-Borbone et al. 2005). Comme nous allons le voir dans la suite du manuscrit, l'activation de Pyk2 via ce complexe protéique conduit une modification de l'excitabilité neuronale via la phosphorylation de canaux ioniques (Lev et al. 1995; Felsch, Cachero, et Peralta 1998; Y. Huang et al. 2001).



**Figure 25 : Recrutement et activation de Pyk2 au niveau de la densité post-synaptique (PSD) (adaptée de de Pins et al., 2021).** Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire augmente, le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  interagit avec la PSD-95 entre ses domaines SH3 et guanylate kinase (GK). Le domaine SH3 peut ainsi interagir avec les motifs PR2 ou PR3 de Pyk2, ce qui facilite son enrichissement dans la PSD. La liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  à PSD-95 favorise sa dimérisation ainsi que le regroupement et l'activation de Pyk2, qui se trouve à proximité des récepteurs NMDA. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  peut également se lier directement à Pyk2 et l'activer (voir figure 24). Pyk2 et les SFKs associées, principalement Fyn et Src, phosphorylent les récepteurs NMDA sur une tyrosine. L'une des conséquences de la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs NMDA est l'augmentation de son expression à la surface des neurones. La principale phosphatase qui s'oppose à ces effets en déphosphorylant les résidus tyrosines sur Pyk2, les SFKs et les récepteurs NMDA est la STEP. Cette dernière est inhibée par sa phosphorylation par la PKA et indirectement activée par la calcineurine, une phosphatase activée par le  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 2) Rôle physiologique

### a. Formation et maintenance des épines dendritiques et des neurites

Plusieurs études dans des lignées cellulaires neuronales ont mis en évidence un rôle de Pyk2 dans la formation et la rétractation des neurites. En effet, Pyk2 a été détectée dans

les cônes de croissance des neurites et l'inhibition de Pyk2 bloque la croissance des neurites dans des cellules PC12 et SH-SY5Y (Ivankovic-Dikic et al. 2000). En réponse au NGF (nerve growth factor) dans les cellules PC12, Pyk2 est activée et s'associe à la paxilline et aux faisceaux d'actine au niveau des sites d'initiation des neurites suggérant un rôle de Pyk2 dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Park, Avraham, et Avraham 2000). De même, Pyk2 forme un complexe de signalisation avec l'ubiquitine-protéine ligase Cbl et la protéine adaptatrice ArgBP2 qui pourrait réguler le cytosquelette d'actine pour former des lamellipodes dans les cônes de croissance de cellules PC12 en différenciation sous l'effet d'un facteur de croissance (Haglund et al. 2004). À l'inverse, l'activation de GSK-3 $\beta$  par Pyk2 entraîne la phosphorylation de la protéine Tau et la rétraction des neurites, probablement via la déstabilisation des microtubules (Sayas et al. 2006). Ces études sur des lignées cellulaires neuronales indiquent donc un rôle de Pyk2 à la fois dans la formation et la rétraction des neurites.

Cette dualité est également retrouvée dans les neurones avec des effets positifs et négatifs sur la formation et le maintien des neurites et des épines dendritiques. Plusieurs résultats suggèrent un rôle de Pyk2 en aval des intégrines, en particulier l'intégrine  $\beta$ 1, dans la formation et la stabilité des épines dendritiques. La formation du complexe Cas/Fyn et la phosphorylation de Pyk2 en aval de l'intégrine  $\beta$ 1 sont inhibées lors de l'activation des neurones de l'hippocampe de souris par EphA4 (ephrin type-A receptor 4) conduisant à la rétractation des épines dendritiques (Bourgin et al. 2007). De même, dans les neurones du cortex orbitofrontal de souris, une diminution de la signalisation de l'intégrine  $\beta$ 1, qui implique Pyk2, entraîne une perte d'épines (Whyte et al. 2021). Chez les souris Pyk2 KO, une diminution du nombre d'épines dendritiques et de clusters de PSD95 a été observée dans les neurones de l'hippocampe, *in vivo* et en culture, qui a pu être restaurée par la réexpression de Pyk2 (Giralt et al. 2017). En revanche, il a également été montré que la surexpression de Pyk2 dans des neurones corticaux en culture altère la migration neuronale via l'inactivation de la GTPase Rac1 en aval des protocadhérines (Fan et al. 2018). Sa surexpression dans des neurones hippocampiques en culture entraîne une perte d'épines dendritiques via cette même voie de signalisation (Suo et al. 2012). De même, la surexpression de Pyk2 entraîne une diminution de la densité synaptique des neurones via l'interaction inhibitrice de Pyk2 avec Graf1c, conduisant à l'activation de la GTPase RhoA ce qui entraîne une contraction de l'actomyosine et ainsi la perte de synapses (S. Lee et al. 2019).

Ces différents travaux dans les lignées cellulaires neuronales et les neurones révèlent des effets opposés de Pyk2 sur les neurites et la formation et/ou le maintien des épines dendritiques. Pyk2 aurait un rôle positif sur les épines via une signalisation cellulaire déclenchée par les intégrines, tandis que sa surexpression ou potentiellement l'augmentation de son activité entrainerait une dérégulation des petites GTPases Rac1 et RhoA conduisant à une perte d'épines dendritiques. Quoi qu'il en soit, ces résultats indiquent la nécessité d'un contrôle strict de Pyk2 pour une régulation normale des épines dendritiques.

#### b. Régulation des canaux ioniques

Comme indiqué précédemment, suite à une stimulation des récepteurs NMDA, Pyk2 interagit avec les protéines PSD95, SAP102 et SAPAP3, favorisant son enrichissement dans la PSD (Seabold et al. 2003; Bongiorno-Borbone et al. 2005; Bartos, Ulrich, Li, Beazely, Chen, Macdonald, et al. 2010). Plusieurs travaux indiquent un rôle de Pyk2 dans l'augmentation des courants NMDA. Dans leur étude, Y. Huang et al., 2001 ont montré que Pyk2 renforce les courants NMDA des neurones de l'hippocampe via l'activation de Src. De même, dans les neurones corticaux, l'activation sélective des récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe I, incluant mGluR1 et mGluR5, par le DHPG ((S)-3,5-dihydroxy-phenylglycine) induit l'activation de Pyk2 et des SFKs Src et Fyn, conduisant à la phosphorylation des tyrosines des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA et ainsi au renforcement de leurs fonctions (Heidinger et al. 2002). Dans des cultures d'hippocampes de rat, l'accumulation de récepteurs NMDA à la membrane synaptique ainsi que l'augmentation des courants dépendants de ces récepteurs par un traitement au BDNF (brain-derived neurotrophic factor) requièrent l'activation de Pyk2 et dépendent de la synthèse locale de protéines Pyk2 à la synapse (Afonso et al. 2019). Chez les souris Pyk2 KO, la phosphorylation de la tyrosine 1472 de NR2B est diminuée tout comme l'expression des récepteurs NMDA et PSD-95 dans la PSD par rapport aux souris WT (Giralt et al. 2017). On ne sait pas si Pyk2 phosphoryle directement les récepteurs NMDA mais des travaux suggèrent que les effets de Pyk2 sont médiés par Src. En effet, dans les neurones de l'hippocampe, l'augmentation de l'activité des récepteurs NMDA induite par la surexpression de Pyk2 est inhibée par un peptide inhibiteur de Src qui n'agit pas sur l'activation de Pyk2 (Y. Huang et al. 2001). De même, la surexpression d'un dominant négatif de Pyk2 n'affecte pas la potentialisation des récepteurs NMDA induite par l'activation

de Src. Ainsi, il semblerait que Src agisse en aval de Pyk2 dans la régulation des récepteurs NMDA.

En revanche, concernant les récepteurs AMPA, très peu de travaux ont été rapportés concernant l'impact de Pyk2 sur l'activation de ces récepteurs. On peut tout de même noter qu'aucune altération de ces récepteurs n'a été observée chez les Pyk2 KO (Giralt et al. 2017).

En plus des récepteurs NMDA, Pyk2 contribue à la régulation de canaux potassiques spécifiques. Pyk2 a été identifiée comme un régulateur du canal potassique voltage-dépendant Kv1.2 via la phosphorylation de tyrosines dans la partie C-terminale cytosolique de ce récepteur conduisant à son internalisation (Lev et al. 1995; Felsch, Cachero, et Peralta 1998; Williams et al. 2007). De plus, Pyk2 est capable de renforcer l'activité des canaux potassiques BK<sub>Ca</sub> de manière dépendante du calcium dans les cellules non-neuronales (Ling, Sheng, et Braun 2004). Dans les neurones, ces canaux peuvent être impliqués dans la modulation de la fréquence des potentiels d'action, bien que l'implication de Pyk2 dans ce phénomène n'ait pas été étudiée (Ha et Cheong 2017).

Ainsi, Pyk2 est capable de moduler l'excitabilité neuronale via la régulation des canaux Kv1.2 et des récepteurs NMDA suggérant un rôle de Pyk2 dans la plasticité synaptique.

### c. Plasticité synaptique

Du fait que la dépolarisation ou le traitement avec des agonistes du glutamate augmente la phosphorylation de Pyk2 dans des neurones en culture ou des tranches d'hippocampes, il a rapidement été proposé un rôle de Pyk2 dans la plasticité synaptique (Siciliano et al. 1996; J. A. Girault et al. 1999; Y. Huang et al. 2001). Ce dernier groupe de recherche a montré que Pyk2 est impliquée dans l'induction de la LTP via l'activation des SFKs et des récepteurs NMDA. En revanche, la perturbation de l'interaction entre Pyk2 et PSD95 abolit l'induction de la LTP par stimulation tétanique dans les neurones de tranches d'hippocampes (Bartos, Ulrich, Li, Beazely, Chen, Macdonald, et al. 2010). Des études sur des souris Pyk2 KO ont mis en avant un rôle différent de Pyk2 selon le protocole de stimulation neuronale utilisé. Ainsi, l'induction de la LTP dans des tranches d'hippocampes de souris Pyk2 KO via un protocole de LTP HFS (high-frequency stimulation, 5 trains d'une seconde de stimulation à 100 Hz séparés de 10 secondes) est abolie chez ces souris alors que lors d'un protocole de LTP TBS (theta-burst stimulation, 10 salves de 4 impulsions délivrées à 100Hz avec un intervalle de 200 ms entre les salves), aucune différence n'est observée par rapport

aux souris WT (Giralt et al. 2017; Salazar et al. 2019; Mastrolia et al. 2021). Ces résultats suggèrent donc que Pyk2 joue un rôle dans la LTP induite par un protocole HFS, un protocole induisant d'intenses stimulations non physiologiques, et ne semble pas intervenir dans un protocole TBS, dont les stimulations sont plus physiologiques (Hernandez et al. 2005). De plus, la LTP induite par un protocole HFS est bloquée par l'utilisation d'inhibiteur de tyrosine kinase, l'inhibition de Src ou chez des souris Fyn KO suggérant que Pyk2 et les SFKs sont nécessaires pour l'induction de la LTP par ce type de protocole (O'Dell, Kandel, et Grant 1991; Grant et al. 1992; Y. M. Lu et al. 1998). Aucun travail n'a démontré l'implication de la phosphorylation de tyrosines sur la régulation des récepteurs AMPA, qui sont le substrat post-synaptique de l'expression de la LTP. Il est donc probable que Pyk2 et les SFKs contribuent à la LTP via la phosphorylation des récepteurs NMDA et/ou de protéines associées (Nicoll 2017).

En plus de son rôle dans la LTP, Pyk2 semble également impliquée dans la LTD puisque celle-ci est abolie par l'utilisation de siRNA dirigés contre Pyk2 ou chez les souris Pyk2 KO (Hsin et al. 2010; Salazar et al. 2019). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-tendant ce rôle dans la LTD ne sont pas encore connus. En effet, la LTD impliquerait davantage une déphosphorylation de la sous-unités GluA2 des récepteurs AMPA plutôt qu'une phosphorylation des tyrosines (Gladding et al. 2009). Un rôle des propriétés de protéine d'échafaudage de Pyk2 a été proposé mais les partenaires impliqués n'ont pas été identifiés (Hsin et al. 2010).

De manière intéressante, Pyk2 et les SFKs pourraient jouer un rôle dans la plasticité de l'excitabilité intrinsèque en régulant le canal potassique Kv1.2. En effet, dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, cette plasticité s'accompagne d'une diminution des courants potassiques via l'endocytose de ce canal (Hyun et al. 2013). Cette dernière est régulée par Pyk2 et les SFKs via la phosphorylation de la partie C-terminale du canal Kv1.2 (Lev et al. 1995; Felsch, Cachero, et Peralta 1998; Nesti, Everill, et Morielli 2004). Ainsi l'inhibition de l'endocytose de ce canal ou de l'activité des protéines kinases bloque cette plasticité intrinsèque (Hyun et al. 2013).

Pyk2 est donc impliquée dans les processus de LTP, de LTD et probablement de plasticité intrinsèque bien que les mécanismes sous-jacents à ces différentes fonctions ne soient pas entièrement élucidés.

#### d. Mémoire et apprentissage

Du fait de son implication dans la plasticité synaptique, un rôle de Pyk2 dans la mémoire et l'apprentissage a été suggéré. Plusieurs laboratoires ont exploré cette hypothèse en utilisant des souris déficientes en Pyk2. Différentes études ont mis en avant des déficits de mémoire spatiale à court terme (un type de mémoire impliquant l'hippocampe dorsal), évaluée par un test de localisation de nouvel objet (NOL pour novel object location), chez les souris Pyk2 KO ou chez des souris WT avec une délétion de Pyk2 induite par adénovirus dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal (Giralt et al. 2017; Mastrolia et al. 2021). Ces déficits sont restaurés par la réexpression bilatérale de Pyk2 dans les neurones de la région CA1 de l'hippocampe. En revanche, l'évaluation de la mémoire spatiale dans le labyrinthe de Morris n'a montré aucune altération de ce type de mémoire chez les souris Pyk2 KO (Salazar et al. 2019). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des différences de protocole. Alors que le NOL n'est réalisé qu'après une seule exposition aux objets, le labyrinthe de Morris nécessite des sessions répétées. Ainsi, l'absence de Pyk2 pourrait altérer uniquement des formes particulières de mémoire spatiale induites par une seule exposition, alors que cette déficience pourrait être surmontée par le recrutement d'autres régions cérébrales et/ou par un entraînement répété. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer ces travaux. Récemment, l'utilisation de souris Pyk2 KO et de souris Pyk2 avec la mutation Y402F, empêchant ainsi sa trans-autophosphorylation, a mis en évidence l'implication de Pyk2 dans la suppression de la peur contextuelle de manière indépendante de sa phosphorylation (Zheng et al. 2022).

#### e. Pyk2 dans les cellules gliales

Bien que majoritairement exprimée dans les neurones, Pyk2 est également présente dans les astrocytes et les cellules microgliales.

Les astrocytes ont une importance critique dans le système nerveux et sont directement impliqués dans les fonctions synaptiques. Dans des astrocytes de rats en culture, Pyk2 peut être activée par la thrombine via la PKC (H. Wang et Reiser 2003) ou alors par l'angiotensine II conduisant à la prolifération des astrocytes (Clark et Gonzalez 2007). Une étude réalisée chez des souris Pyk2 KO a mis en évidence un rôle de Pyk2 dans la régulation de la migration des astrocytes (Giralt, Coura, et Girault 2016). Suite à une lésion physique du

cortex moteur, les astrocytes des souris Pyk2 KO présentaient un retard de migration par rapport aux souris WT et une perturbation de la repolymérisation de l'actine après un traitement à la latrunculine B, une toxine permettant la dépolymérisation de l'actine. Ce rôle de Pyk2 dans la régulation de la migration des astrocytes pourrait impliquer son interaction avec la gelsoline au niveau des lamellipodes des astrocytes, comme c'est le cas dans les ostéoclastes (Q. Wang et al. 2003; Giralt, Coura, et Girault 2016). Pyk2 peut également jouer un rôle dans les réponses antioxydantes des astrocytes, comme l'indique son implication dans l'augmentation de l'hème oxygénase-1 (HO-1) induite par l'acide arachidonique (C.-C. Lin et al. 2018).

Dans la microglie d'un cerveau de rat adulte, Pyk2 est phosphorylée et colocalise avec la MAPK p38 phosphorylée suite à une ischémie suggérant un rôle de Pyk2 dans les cascades de signalisation en réponse à des signaux de stress (Tian, Litvak, et Lev 2000). Pyk2 est également impliquée dans la réponse neurotoxique aux fragments amyloïdogéniques et aux protéines prions dont nous parlerons dans la suite du manuscrit (Combs et al. 1999).

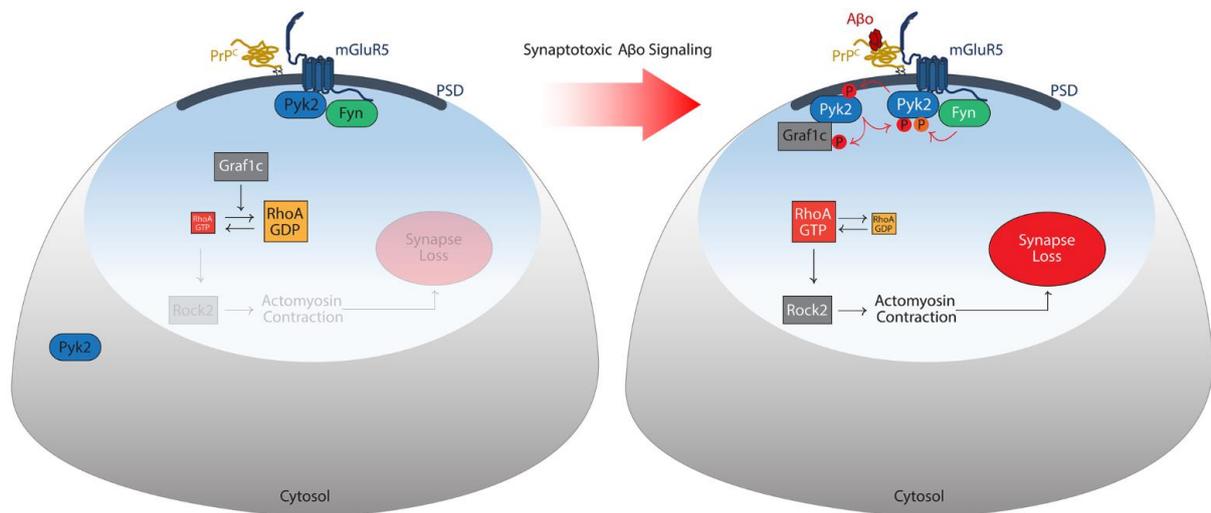
Je vous ai donc présenté différentes fonctions physiologiques de Pyk2 dans le système nerveux central. Cependant, de nombreuses études ont mis en avant l'implication de Pyk2 dans de nombreux troubles du système nerveux tels que l'ischémie, l'épilepsie, les troubles psychiatriques ou encore les maladies de Huntington et de Parkinson (pour revue voir de Pins et al., 2021). Dans cette dernière partie d'introduction, nous nous focaliserons sur le rôle physiopathologique de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer.

### 3) Implication de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer

Au cours des dix dernières années, de multiples travaux ont mis en évidence l'implication de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer. Cet engouement provient d'une étude génomique (GWAS pour genome-wide association studies) réalisée en 2013 qui a, pour la première fois, identifié le gène *PTK2B* comme un locus de susceptibilité des formes tardives de la maladie d'Alzheimer (LOAD) (European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013). Suite à cette étude, de nombreuses autres GWAS ont répliqué cette découverte (Beecham et al. 2014; Jiao et al. 2015; X. Wang et al. 2015; Nettiksimmons et al. 2016; Lawingco et al. 2021; Schwartzenruber et al. 2021). Dans la maladie d'Alzheimer, Pyk2 semble associée à la sclérose hippocampique (Beecham et al. 2014), à la progression de la maladie (X. Wang et al. 2015) et au déclin cognitif (Nettiksimmons et al. 2016). Jusqu'à présent, aucune altération de la

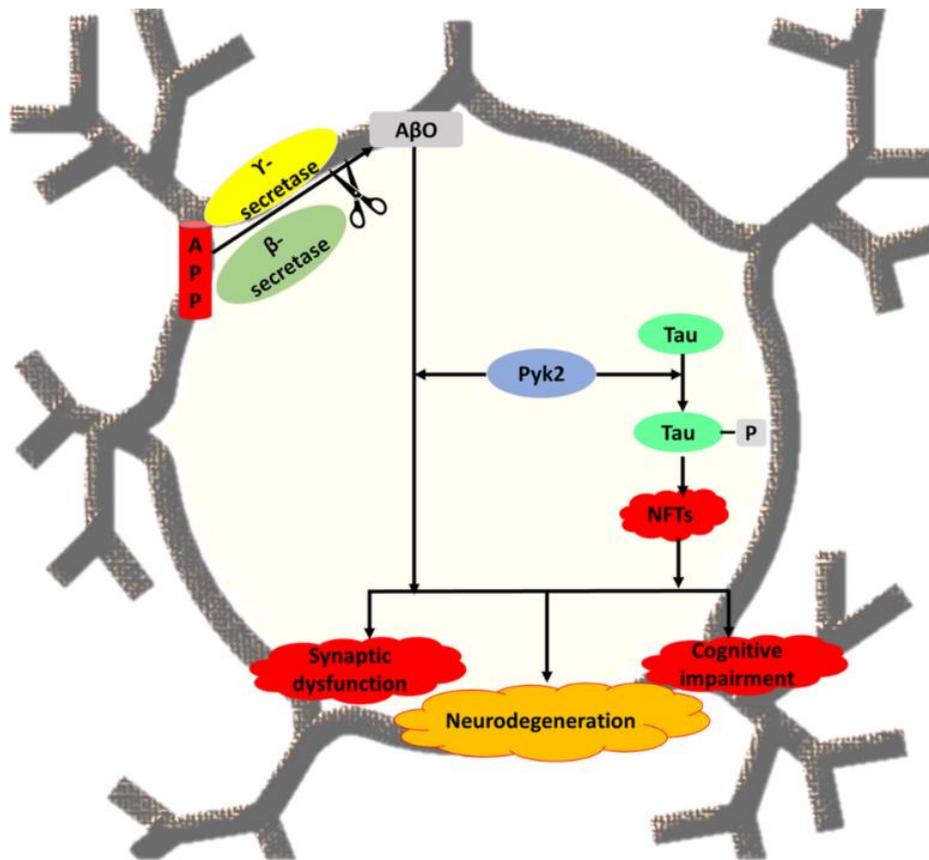
séquence codante de *PTK2B* n'a été rapportée et les variants sont plutôt liés à des modifications d'expression. Le polymorphisme nucléotidique (SNP pour single nucleotide polymorphism) à risque initialement identifié, rs28834970C, est associé à une augmentation de l'expression de l'ARNm de *PTK2B* dans les monocytes de sujets sains (Chan et al. 2015). Une étude récente sur le transcriptome a révélé une association entre la maladie d'Alzheimer et l'augmentation de l'expression de *PTK2B* dans les monocytes (Harwood et al. 2021). Ces observations suggèrent que le risque de LOAD est associé à une augmentation de l'expression protéique de Pyk2 dans les monocytes, et probablement dans les macrophages résidents dans les tissus tels que les cellules microgliales, et éventuellement dans d'autres types de cellules.

Différents laboratoires ont identifié un rôle de Pyk2 dans la cascade de signalisation induisant les déficiences observées dans la maladie d'Alzheimer. Chez des souris APPSwe/PSEN1ΔE9, un modèle transgénique de souris Alzheimer, la délétion génétique de Pyk2 inhibe la survenue des effets délétères des Aβ sur la plasticité synaptique et les troubles comportementaux (Salazar et al. 2019). De même, l'absence de Pyk2 dans ces souris empêche la perte synaptique induite par les Aβ. Ce même groupe de chercheur a montré qu'un traitement de tranches de cerveaux par des Aβ induit la phosphorylation de Pyk2 et de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA (Kaufman et al. 2015). L'utilisation d'un inhibiteur de Fyn, l'AZD0530, abolit ces phosphorylations induites par les Aβ, et son utilisation chez des souris APPsw/PSEN1ΔE9 reverse les pertes synaptiques et les déficits de mémoire spatiale observés chez ces souris. Cet effet des Aβ sur la perte d'épines dendritiques via Pyk2 et Fyn impliquerait le complexe PrP<sup>c</sup>/mGluR5 (Haas et al. 2016). Un mécanisme a été proposé par S. Lee et al., 2019 selon lequel la fixation des Aβ sur son récepteur PrP<sup>c</sup> va conduire à l'activation successive de Fyn et Pyk2 entraînant la perte des épines dendritiques via la contraction des faisceaux d'actine par RhoA (**Figure 26**).



**Figure 26 : Modèle d'action de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer (adaptée de S. Lee et al., 2019).** Chez des sujets sains (à gauche), l'activation de Pyk2 et de Fyn est limitée et Graf1c inhibe activement la signalisation RhoA vers le cytosquelette d'actine pour maintenir la morphologie synaptique. Dans la maladie d'Alzheimer (à droite), les A $\beta$ o se lient à PrP<sup>C</sup> pour engager mGluR5 et activer la kinase Fyn. Fyn phosphoryle à son tour la kinase Pyk2 ce qui entraîne son activation, sa trans-autophosphorylation et son recrutement à la PSD. Pyk2 interagit alors physiquement avec Graf1c, la phosphoryle, inhibant ainsi son activité GAP (GTPase activating protein). La perte de fonction de Graf1c permet l'augmentation de l'activité de RhoA et la contraction de l'actine via Rock2, entraînant ainsi la rétractation des épines dendritiques et la perte synaptique.

Plusieurs travaux ont également mis en évidence un lien entre Pyk2 et la tauopathie observée dans la maladie d'Alzheimer. En effet, Pyk2 colocalise avec Tau hyperphosphorylée et les oligomères de Tau dans le cerveau de patients Alzheimer et dans un modèle de souris tauopathique (Köhler, Dinekov, et Götz 2013; Dourlen et al. 2017). De plus, Pyk2 interagit avec Tau et la phosphoryle sur sa tyrosine 18 *in vitro* et *in vivo* (C. Li et Götz 2018). Pyk2 peut également participer à l'augmentation de la phosphorylation de Tau de manière indirecte, via l'activation de GSK-3 $\beta$  (Hooper, Killick, et Lovestone 2008). Ainsi, Pyk2 pourrait contribuer aux effets toxiques de Tau en la phosphorylant directement ou indirectement, favorisant ainsi son agrégation. Cependant, la délétion génétique de Pyk2 n'impacte pas la propagation de la pathologie Tau dans le cerveau de souris micro-injectées avec de la Tau provenant de patients Alzheimer (Nies et al. 2021). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un rôle de Pyk2 dans l'induction de la maladie d'Alzheimer où elle pourrait lier les pathologies A $\beta$  et Tau dans le cadre de l'hypothèse de la cascade amyloïde (**Figure 27**).



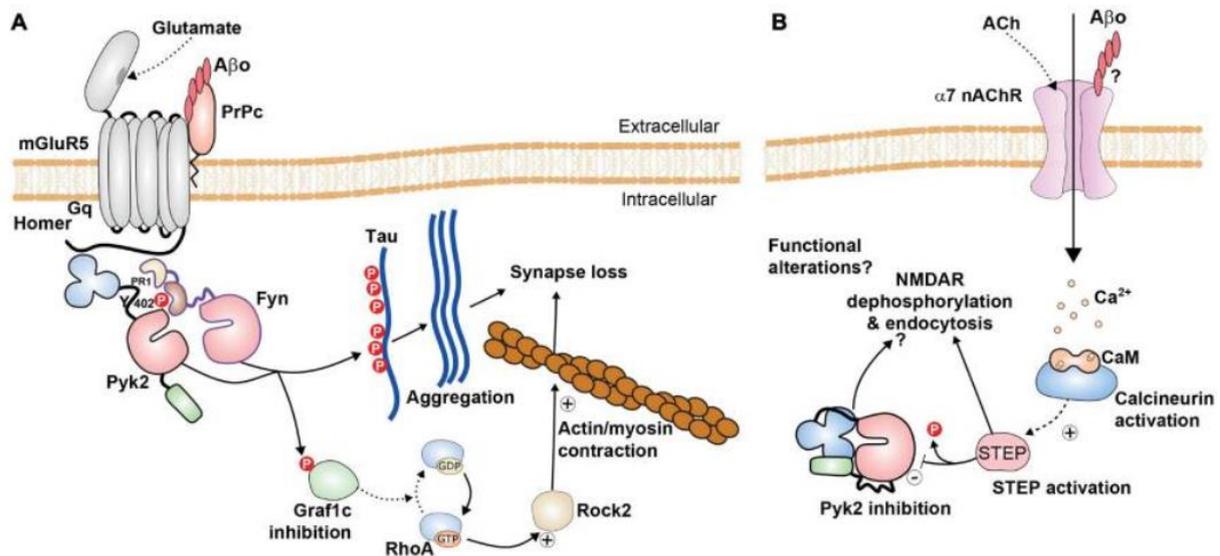
**Figure 27 : Mécanismes par lesquels Pyk2 pourrait influencer la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (adaptée de R. Kumar et al., 2022).**

Au contraire, différentes études ont montré un rôle protecteur de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer. Chez des souris 5xFAD, un modèle de souris Alzheimer exprimant trois mutations de l'*APP* et deux mutations de *PSEN1*, une diminution de la phosphorylation de Pyk2 a été observée à 8 mois (Giralt et al. 2018). De plus, la délétion génétique de Pyk2 dans ces souris n'a entraîné aucune modification phénotypique. En revanche, la surexpression de Pyk2 dans l'hippocampe de ces souris restaure les niveaux de phosphorylation de Pyk2, augmente le nombre de synapses et améliore les troubles comportementaux. De même, Kilinc et al., 2020 ont montré que la surexpression de Pyk2 spécifiquement dans le compartiment post-synaptique des neurones hippocampiques, grâce à un système de culture microfluidique, protège les neurones de la synaptotoxicité induite par les A $\beta$ . Ainsi, un déficit fonctionnel de Pyk2 pourrait jouer un rôle dans ces modèles de la maladie d'Alzheimer. Les A $\beta$  pourraient induire ce déficit fonctionnel de Pyk2 via l'activation de la STEP, la principale phosphatase de Pyk2. Il a été montré que l'expression de la STEP est augmentée dans le cortex d'un modèle de souris Alzheimer et de patients (Chin et al. 2005; Kurup et al. 2010). L'A $\beta$  peut activer la STEP via un mécanisme impliquant l'activation des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine

$\alpha 7$  et la calcineurine conduisant à une déphosphorylation et une diminution de l'expression des récepteurs NMDA à la surface des synapses (Snyder et al. 2005). Lorsque des souris 3xTg (présentant les mutations APPsw, Tau P301L, et PSEN1 M146V) sont croisées avec des souris STEP KO, les déficits cellulaires et cognitifs de ces souris Alzheimer sont restaurés (Yongfang Zhang et al. 2010). De même, l'inhibition pharmacologique de la STEP par le TC-2153 dans ce modèle 3xTg s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de Pyk2 et de l'amélioration des fonctions cognitives, sans modification des niveaux d'A $\beta$  et de Tau phosphorylée (Xu et al. 2014). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité de la STEP et la diminution des voies de phosphorylation de la tyrosine, y compris celles médiées par Pyk2, pourraient avoir un effet néfaste dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Récemment, bien qu'ils aient montré l'implication de Pyk2 dans les effets synaptotoxiques de l'A $\beta$ , Brody et al., 2022 ont mis en avant un effet suppresseur de Pyk2 sur la toxicité de Tau. En effet, la délétion génétique de Pyk2 chez des souris PS19, un modèle de souris tauopathique, conduit à une augmentation de la phosphorylation et de l'accumulation de Tau, une diminution de la survie des souris et une perturbation de la mémoire spatiale.

En plus de son implication neuronale dans la pathologie, Pyk2 pourrait exercer des fonctions au niveau microgliale. Ainsi, l'A $\beta$  fibrillaire stimule la sécrétion de facteurs neurotoxiques par la microglie via une voie de signalisation impliquant la PKC et Pyk2 (Combs et al. 1999). Dans les monocytes, TRPM2 active une voie Pyk2/ERK conduisant à la génération de chimiokines et exacerbant l'inflammation (S. Yamamoto et al. 2008). Cette voie de signalisation est impliquée dans l'activation microgliale par l'A $\beta$  et la génération subséquente du facteur cytotoxique TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), Pyk2 jouant un rôle de rétroaction positive sur le canal TRPM2 (Alawieyah Syed Mortadza et al. 2018).

Ces données démontrent donc que Pyk2 est capable de jouer de multiples rôles dans la maladie d'Alzheimer (**Figure 28**). Dans les neurones, Pyk2, en interaction avec Fyn, est un médiateur de la toxicité de l'A $\beta$  et peut relier les effets de l'A $\beta$  à la phosphorylation aberrante de Tau, ce qui en fait un acteur clé potentiel de la cascade amyloïde. D'autre part, un déficit fonctionnel de Pyk2, potentiellement via une activité STEP augmentée, peut contribuer à certains aspects des déficits fonctionnels dans les modèles de souris Alzheimer. Il est possible que l'un ou l'autre de ces deux mécanismes opposés soit prédominant en fonction du modèle expérimental et des conditions utilisées.



**Figure 28 : Rôles possibles de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer (adaptée de de Pins et al., 2021).** **(A) Rôle délétère.** Pyk2 peut être associée au complexe mGluR5/Prp<sup>c</sup>, associé à Homer. La fixation des Aβo à Prp<sup>c</sup> entrave la signalisation normale de mGluR5 mais déclenche l'activation de Fyn et de Pyk2. Ces kinases phosphorylent la protéine Tau et peuvent ainsi faciliter son agrégation et la formation de DNFs. Pyk2 phosphoryle également Graf1c, inhibant son activité, augmentant ainsi la RhoA/GTP active, ce qui entraîne l'activation de Rock2 et la contraction de l'actine/myosine qui peut contribuer aux altérations synaptiques. **(B) Rôle protecteur.** L'activation de la STEP, par exemple après l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine α7 (α7nAChR) et l'activation de la calcineurine, peut entraîner une déphosphorylation de Pyk2 et des récepteurs NMDA, une diminution de l'expression des récepteurs NMDA à la surface, et des altérations synaptiques fonctionnelles. L'équilibre entre les mécanismes décrits en (A) et (B) n'est pas connu et peut dépendre des modèles expérimentaux et des conditions. D'autres rôles de Pyk2 sont possibles mais n'ont pas été explorés, y compris dans les cellules microgliales.



## Objectifs

---

Face au besoin de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter ou prévenir la maladie d'Alzheimer, l'identification de facteurs de risques génétiques associés à la maladie suscite un intérêt grandissant. En effet, cette prédisposition génétique représente 60 à 80% du risque de développer une forme sporadique de la maladie. Parmi ces facteurs de risques, le gène *PTK2B* codant pour la protéine Pyk2 a été identifié comme étant associé à cette pathologie neurodégénérative. Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont suggéré un rôle de Pyk2 dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Ce rôle fait cependant l'objet d'une dualité opposant des mécanismes délétères et protecteurs observés dans différents laboratoires, ce qui complexifie la compréhension de son implication dans la maladie. Bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore bien compris, Pyk2 semblerait jouer un rôle dans la synaptotoxicité observée dans la maladie. Il paraît donc crucial de caractériser son rôle physiopathologique et d'identifier ses partenaires potentiels en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif de ce travail de thèse est donc de clarifier le rôle de Pyk2 au niveau synaptique et son implication dans un contexte pathologique. Pour cela, mon projet s'est décomposé en trois parties :

- 1) Etudier le rôle de Pyk2 sur la densité synaptique dans un contexte physiologique et pathologique.
- 2) Evaluer l'impact des oligomères d'A $\beta$  (A $\beta$ <sub>o</sub>) sur l'expression et l'activation de Pyk2 ainsi que l'effet d'une délétion génétique de Pyk2 sur les perturbations de la neurotransmission engendrées par les A $\beta$ <sub>o</sub>.
- 3) Déterminer les relations existantes entre les protéines Pyk2 et Tau et leurs implications au niveau synaptique.

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé des transfections neuronales sur des cellules en culture. Nous avons également effectué des fractionnements cellulaires afin d'isoler le compartiment post-synaptique dans des cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris ainsi que dans des tissus d'hippocampes de souris APP/PS1-21 et Pyk2 KO. Des enregistrements électrophysiologiques ont également été réalisés en présence ou non d'A $\beta$ <sub>o</sub> sur des tranches d'hippocampes de souris Pyk2 KO. Enfin, nous avons effectué des expériences *in vitro* afin de caractériser le rôle kinasique de Pyk2 sur Tau.



# Matériel et Méthodes

---

## I. Animaux

Toutes les expériences impliquant des animaux ont été réalisées conformément aux directives de protection des animaux en accord avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/CEE), conformément aux directives nationales françaises de protection des animaux (protocole APAFIS#39213-202210071415768) et avec l'approbation du Comité d'éthique de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. Dans cette étude, quatre lignées de souris ont été utilisées :

- 1) Des souris Swiss CD1 gestantes de  $15 \pm 1$  jours (Janvier, Lyon, France).
- 2) Des souris wild-type (WT) sur fond génétique C57BL/J6 (Janvier, Lyon, France).
- 3) Un modèle de souris transgénique APP/PS1-21 coexprimant la mutation Swedish (KM670/671NL) du gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP<sub>sw</sub>) et la mutation humaine L166P du gène de la préséniline 1 (PS1). Chez ces souris, l'expression de l'APP humaine est trois fois supérieure à celle de l'APP murine. Les souris expriment les transgènes sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1 et sont générées sur un fond génétique C57BL/J6.
- 4) Un modèle de souris transgénique Pyk2 knock-out généreusement fourni par l'équipe de Jean-Antoine Girault de l'Institut du Fer à Moulin à Paris. Cette lignée a été générée au sein cette équipe comme précédemment décrit (Giralt, Coura, et Girault 2016). Brièvement, une recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires a été réalisée. Un vecteur de ciblage contenant des régions homologues aux séquences génomiques de *PTK2B* a été construit pour la délétion des exons 15 à 18 de *PTK2B*, correspondant au domaine kinase. L'épissage entre les exons 14 et 19 est hors cadre ce qui entraîne un codon STOP prématuré dans l'exon 19.

Les souris ont été génotypées au laboratoire à partir d'une biopsie de la queue. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN sont les suivantes :

Pyk2 forward : 5'-TGTGCTCAGAGAAAACGGAGGAACCCT-3'

Pyk2 reverse 1 : 5'-CATTGATTCCTGCTTCAGCCCTGGTCTAA-3'

Pyk2 reverse 2 : 5'-GCCCATCGGGGCGATTTAAATATAATTCG-3'.

Les animaux utilisés ont été hébergés en groupe au sein de l'animalerie de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, selon un cycle lumière/obscurité de 12h, avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

## II. Culture cellulaire et transfection

### A. Culture primaire de neurones corticaux

Les cultures de neurones corticaux ont été réalisées à partir d'embryons de  $15 \pm 1$  jours de développement embryonnaire de souris Swiss CD1 (Janvier, Lyon, France). Après extraction des cerveaux, les méninges ont été retirées et les cortex ont été disséqués. Ces derniers ont été dissociés mécaniquement puis mis en culture dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Lyon, France) supplémenté avec 5% de sérum de cheval (Thermo Scientific), 5% de sérum bovin fœtal (Sigma, Lyon, France) et 1 mM de glutamine (Sigma, Lyon, France). Pour la microscopie confocale, les neurones ont été mis en culture dans des coupelles avec un fond en verre de 35 mm (MatTek, Ashland, MA, USA). Des plaques 12 puits (Falcon, Corning, N.Y., USA ; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) ont été utilisées pour les expériences biochimiques. Les coupelles et plaques ont préalablement été coatées avec 0.1 mg/mL de poly-D-lysine et 0.02 mg/mL de laminine (Sigma, Lyon, France). Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>/95% d'air jusqu'à leur utilisation pour les différentes expériences. Les neurones sur plaques 12 puits ont été rincés avec du DMEM puis traités avec 100 nM d'oligomères d'A $\beta$  (voir protocole III.A) pendant 1h, 6h (DIV14) ou 24h (DIV13) avant d'être utilisés pour les expériences de biochimie.

### B. Plasmides

Les plasmides codant pour GFP-Pyk2 WT, GFP-Pyk2 Y402F, GFP-Pyk2 K457A, GFP-Pyk2 FERM et GFP-Pyk2 Delta FERM / PR1 de rat ont été généreusement fournis par l'équipe de Jean-Antoine Girault de l'Institut du Fer à Moulin à Paris. L'ADNc de ces constructions a été cloné dans le vecteur pmCherry-C1 (Clontech) en utilisant les enzymes de restriction SacI et KpnI afin de remplacer la GFP par la mCherry en N-terminal. Le plasmide codant pour mCherry-Pyk2 P413/416A de rat a été obtenu par mutagénèse dirigée du plasmide codant pour mCherry-Pyk2 WT. Les plasmides codant pour la LifeActine-GFP et la LifeActine-RFP

proviennent de l'entreprise Ibidi (respectivement vecteur pCMV-LifeAct-TagGFP2 et pCMV-LifeAct-TagRFP). L'ADNc de l'Actine GFP humain a été cloné dans le vecteur peGFP-N1 (Clontech) en utilisant les enzymes de restriction Sall et AgeI. La construction mCherry-Tau 1N4R humaine a été obtenue en remplaçant la GFP de la construction GFP-Tau 1N4R humaine contenant le vecteur peGFP-C1 (Clontech) par la mCherry à l'aide des enzymes de restriction AgeI et BspEI. Les ADNc de BACE1 de souris et de Pyk2 WT de rat ont été clonés dans le vecteur pBiFC-VN173 (Addgene) à l'aide des enzymes de restriction SacI et HindIII. L'ADNc de Tau humaine-VC155 a été cloné dans le vecteur pBiFC-VC155 (Addgene) en utilisant les enzymes de restriction Sall et BglII. La construction BACE1-VC155 a été obtenue en remplaçant la GFP du vecteur peGFP (Clontech) par la construction BACE1-VC155 en utilisant les enzymes de restriction PstI et NotI. La construction APPsw humaine-GFP-GSG-T2A-LifeActine GFP a été obtenue en introduisant la séquence APPsw humaine GFP-GSG-T2A dans le plasmide pCMV-LifeAct-TagGFP2, en amont de la LifeActine-GFP, à l'aide des enzymes de restriction NheI et XhoI. La séquence GSG-T2A (appelée T2A dans la suite du manuscrit) permet de produire deux protéines distinctes à partir d'un plasmide unique via un saut ribosomal s'effectuant entre les résidus glycine et proline se situant à l'extrémité C-terminale de la séquence T2A (Z. Liu et al. 2017). La construction Pyk2 WT GFP-GSG-T2A-LifeActine GFP a été obtenue en remplaçant l'APPsw de la construction précédente par Pyk2 WT.

Tous ces plasmides ont été construits à l'aide du kit Pro Ligation-Free Cloning (Applied Biological Materials, Canada) puis ont été vérifiés par séquençage. La purification des plasmides a été réalisée en utilisant le kit NucleoBond Xtra Midi EF (MACHEREY-NAGEL) selon le protocole décrit.

### C. Transfection neuronale

Les transfections ont été réalisées sur des cultures de neurones corticaux après 11 à 13 jours *in vitro* (DIV pour days *in vitro*) en utilisant la méthode du phosphate de calcium. Le milieu de croissance (DMEM et sérums) a été retiré et conservé à 37°C jusqu'à la dernière étape de transfection. Les cellules ont été lavées avec du DMEM puis incubées à 37°C pendant 30 minutes dans du DMKY (1 mM acide kynurénique, 0.9 mM NaOH, 0.5 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% rouge phénol, pH 7.4). Pendant ce temps, 3 µg de chaque plasmide (**Tableau 1**) ont été incubés avec 1M de CaCl<sub>2</sub> et de l'HEPES-buffered saline (HBS - 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0.75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.06) pendant 15 minutes à température ambiante pour

précipiter l'ADN. Ce mélange contenant les plasmides a ensuite été appliqué sur les neurones pendant 2h puis les neurones ont été rincés avec du DMEM lui-même remplacé par le milieu de croissance conservé à 37°C au début de la transfection. Les neurones ont été replacés dans l'incubateur pendant 48h, jusqu'à leur utilisation pour la microscopie confocale (DIV 13 à 15).

Figures 4, 5, 7 et 11	LifeActine-GFP	-
Figures 4 et 5	LifeActine-GFP	mCherry-Pyk2 WT
Figure 4	LifeActine-GFP	mCherry-Pyk2 Y402F
		mCherry-Pyk2 K457A
Figure 5	LifeActine-GFP	mCherry-Pyk2 FERM
		mCherry-Pyk2 DeltaFERM / PR1
		mCherry-Pyk2 P413/416A
Figure 6	Actine-GFP	-
		mCherry-Pyk2 WT
		mCherry-Pyk2 P413/416A
Figure 7	APPsw GFP-T2A-LifeActine GFP	-
		mCherry-Pyk2 WT
		mCherry-Pyk2 P413/416A
Figure 8	LifeActine RFP	Pyk2 WT-VN173 + Tau 1N4R-VC155
		Pyk2 WT-VN173 + BACE1-VC155
		BACE1-VN173 + Tau 1N4R-VC155
Figure 11	LifeActine-GFP	mCherry-Tau 1N4R
	GFP-Pyk2 WT-T2A-LifeActine-GFP	-
		mCherry-Tau 1N4R

**Tableau 1 : Combinaisons de plasmides utilisées lors des expériences de transfection dans les cultures primaires de neurones corticaux.**

## D. Imagerie confocale sur neurones vivants

### 1) Analyse de la densité synaptique

Le milieu des neurones transfectés a été remplacé par une solution d'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution - 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM HEPES, 5 mM D-glucose, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glycine). Les neurones ont été

visualisés à l'aide du microscope confocal Nikon Ti C2 équipé d'un objectif Nikon 60X à immersion dans l'eau et du logiciel NIS-Elements (Nikon, Melville, NY, USA). L'excitation des fluorophores GFP et mCherry/RFP a été réalisée avec un laser à argon excité respectivement à 488 nm (émission filtrée à 504-541 nm) et 543 nm (émission filtrée à 585-610 nm). Les images ont été acquises sous forme de Z-stack (section tridimensionnelle) avec un pas de 0,3  $\mu\text{m}$ . Les images acquises ont ensuite été déconvoluées à l'aide du logiciel AutoQuantX3 (Media Cybernetics, Abingdon, Oxon, UK). La densité des épines dendritiques a été évaluée à l'aide du logiciel NeuronStudio (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA) qui permet une mesure automatique de la longueur des dendrites et du nombre d'épines associées.

## 2) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Le milieu des neurones transfectés a été remplacé par une solution d'HBSS comme décrit ci-dessus. L'Actine-GFP des épines dendritiques a été photoblanchit à 405 nm et la récupération de la fluorescence a été mesurée pendant 120 secondes (1 sec/image). L'analyse du signal de fluorescence a été réalisée avec le logiciel Nikon Nis-Elements.

## III. Analyses biochimiques

### A. Production et purification d'oligomères d'A $\beta$ -poly-histidine

L'ADNc codant pour le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> humain comprenant une étiquette histidine a été cloné dans le vecteur pet28a (Novagene) à l'aide des enzymes de restriction Nde1 et PspXI. Des bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Lucigen, Euromedex) ont été transformées en utilisant ce plasmide, suivie par une incubation d'une nuit dans du milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C. L'expression de la protéine a ensuite été induite par 1 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 3-4h à 37°C et les cellules ont été collectées par centrifugation à 5500 x g pendant 15 minutes. Le culot a été remis en suspension dans du PBS et lysé par sonication (7 cycles d'une minute ON et 30 secondes OFF avec une amplitude de 40%). L'extrait cellulaire a ensuite été centrifugé à 15300 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans du PBS contenant 8 M d'urée, soniqué et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant a été conservé sous forme de corps d'inclusion, une fraction enrichie en protéines A $\beta$  induites, puis filtré à l'aide d'une seringue

(taille des pores 0.45  $\mu\text{m}$ ) afin d'éliminer tout débris cellulaires. Le surnageant clarifié correspondant aux corps d'inclusion a été incubé avec une résine agarose Ni-NTA agarose (MACHEREY-NAGEL) dans du tampon (PBS pH 7.4, 10 mM imidazole) pendant 1h à 4°C sous agitation. Ce mélange réactionnel a été chargé sur une colonne en verre où les protéines non marquées avec l'histidine ont été éliminées avec un tampon de lavage (PBS pH 7.4, 20 mM imidazole). Les protéines contenant l'étiquette histidine ont été éluées avec un tampon d'éluion (PBS pH 7.4 contenant successivement 250 puis 500 mM d'imidazole). La concentration d'A $\beta$  élués a été mesurée à l'aide d'une gamme BSA par SDS-PAGE. La protéine a été conservée à -20°C.

## B. Fractionnement cellulaire

Afin d'isoler le compartiment post-synaptique (PSD), un fractionnement cellulaire a été réalisé à partir de neurones corticaux en culture, de cortex ou d'hippocampes de souris. Les échantillons ont été maintenus à 4°C pendant toutes les étapes de l'expérience. Les cellules ou tissus ont été homogénéisés dans une solution 1 (0.32 M sucrose, 10 mM d'HEPES, pH 7.4). Les homogénats ont été centrifugés à 1000 x g pendant 10 minutes pour éliminer les noyaux et les gros débris. Les surnageants ont été centrifugés à 12000 x g pendant 20 minutes pour obtenir une fraction membranaire brute qui a ensuite été remise en suspension deux fois dans une solution 2 (4 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) puis centrifugée 20 minutes à 12000 x g. Le culot obtenu a été remis en suspension dans une solution 3 (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 pour les cellules et 1% Triton X-100 pour les tissus, pH 7.2), incubé pendant 1h à 4°C sous agitation puis centrifugé à 12000 x g pendant 20 minutes afin de culotter la fraction post-synaptique. Le surnageant contenant la fraction non-PSD a été recueilli. Le culot a été remis en suspension dans une solution 4 (20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 1% acide désoxycholique, 1% SDS, pH 7.5), incubé pendant 1h à 4°C sous agitation et centrifugé à 10000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant contenant la fraction PSD a été recueilli. Des inhibiteurs de protéases (Sigma #P8340-5ML) et de phosphatases (Sigma #P5726-5ML) dilués au 1/100 ont été ajoutés à toutes les solutions juste avant leur utilisation. L'intégrité des fractions PSD et non-PSD a été vérifiée par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la synaptophysine et PSD95, respectivement enrichies dans la fraction non-PSD et PSD.

## C. Western Blot

Les échantillons (cellules ou tissus) ont été lysés mécaniquement, sur glace, dans du tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% désoxycholate de sodium, 0.1% de SDS) additionné d'inhibiteurs de protéases (Sigma #P8340-5ML) et de phosphatases (Sigma #P5726-5ML) dilués au 1/100. Leur concentration protéique a été déterminée à l'aide du dosage Pierce BCA (Thermo Scientific) et du lecteur de plaques Pherastar (BMG Labtech). Les échantillons ont ensuite été dilués dans du tampon de Laemmli (Bio-Rad #1610747) contenant 10% de  $\beta$ -mercaptoéthanol puis chauffés à 95°C pendant 10 minutes. Un SDS-PAGE a été réalisé avec une quantité égale de protéines (10 à 20  $\mu$ g de protéines) sur gels pré-coulés en polyacrylamide 10% (Bio-Rad). Les protéines ont été transférées sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF) à l'aide du système de Transblot (Transblot Turbo, Bio-Rad). Les membranes ont ensuite été saturées dans du TBS contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-T) et 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 2h à 37°C puis incubées une nuit sous agitation et à 4°C avec les anticorps primaires suivant : anti-Pyk2 1/2000 (#3480, Cell Signaling), anti-Pyk2 phospho Y402 1/1000 (#BS-3400R, Invitrogen), anti-tubuline  $\beta$ 3 1/10000 (#801201, BioLegend), anti-PSD95 1/10000 (#MABN68, Merck), anti-synaptophysine 1/1000 (#MAB329-C, Merck), anti-Tau 1/10000 (#A0024, Dako), anti-Tau phospho Thr181 1/1000 (#846602, BioLegend), anti-Tau phospho Tyr18 (#GTX54658, GeneTex), anti-histidine (#34600, Qiagen). Après des rinçages successifs en TBS-T, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin (1/40000) ou anti-IgG de souris (1/40000) conjugués à la HRP (horseradish peroxidase) (Jackson ImmunoResearch) pendant 1h à température ambiante. Les protéines spécifiques ont été visualisées à l'aide de la solution Immobilon ECL Ultra (Merck) et du système de détection Chemidoc (Bio-Rad). L'analyse a été effectuée avec le logiciel ImageJ ou Image Lab.

## D. Co-immunoprécipitation

Les neurones corticaux en culture ont été lysés mécaniquement dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100) auquel ont été ajoutés des inhibiteurs de protéases (Sigma #P8340-5ML) et de phosphatases (Sigma #P5726-5ML) dilués au 1/100. Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé à 50000 x g 35 minutes à 4°C puis la concentration protéique du surnageant (input) a été mesurée à l'aide du dosage Pierce BCA

(Thermo Scientific). Pendant ce temps, 30  $\mu$ L de billes magnétiques couplées à la protéine A, préalablement lavées avec du TBS, ont été incubées dans une solution de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) contenant l'anticorps primaire (anti-Pyk2 (#3480, Cell Signaling) 1/50, anti-Tau (#A0024, Dako) 1/50, ou sans anticorps pour le contrôle négatif) pendant 1h à température ambiante sur roue. 250  $\mu$ g de protéines ont ensuite été ajoutées à la solution billes/anticorps et incubées pendant une nuit à 4°C sur une roue. Le complexe immunoprécipité a été lavé trois fois avec du TBS puis les protéines accrochées aux billes ont été éluées avec un tampon d'éluion (PBS, Laemmli (Bio-Rad #1610747) contenant 10% de  $\beta$ -mercaptoéthanol). L'éluat a été chauffé à 95°C pendant 10 minutes puis un Western Blot a été réalisé afin d'identifier les protéines co-immunoprécipitées.

## IV. Etude *in vitro*

### A. Purification de Tau 1N4R

La protéine Tau recombinante humaine 1N4R a été généreusement fournie par l'équipe d'Isabelle Arnal de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. Elle a été purifiée comme décrit précédemment (Ramirez-Rios et al. 2016). La protéine Tau 1N4R recombinante comprenant une étiquette histidine a été purifiée à l'aide de Talon metal affinity resin (Clontech) puis par chromatographie d'exclusion de taille dans du tampon BRB80 (K-PIPES 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 2 M, K-EGTA 0.5 M, pH 6.8).

### B. Production et purification de Pyk2

L'ADNc codant pour la protéine Pyk2 de rat comprenant une étiquette histidine à l'extrémité C-terminale a été cloné dans le vecteur pet28a (Novagene) à l'aide des enzymes de restriction NcoI et NotI. Après la transformation dans *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Lucigen, Euromedex), les cellules ont été cultivées dans du milieu LB à 37°C. L'expression de la protéine a ensuite été induite par 1 mM d'IPTG et incubée une nuit à 18°C. Les cellules cultivées ont été collectées et remises en suspension dans un tampon de lyse (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM imidazole, pH 8) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail, GE, Healthcare), 0.1 mg/mL de lysozyme (Sigma), 10  $\mu$ g/mL de DNase et 10  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub>. La lyse cellulaire a été réalisée par sonication pendant 5 minutes

(15 secondes ON et 10 secondes OFF) avec une amplitude de 60%. Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation à 140000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le lysat total a été chargé dans une colonne d'affinité au nickel (Bio-Rad). La colonne a été lavée abondamment avec du tampon de lavage (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM imidazole, pH 8) puis la protéine a été éluée à l'aide d'un tampon d'éluion (300 mM KCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM imidazole pH 8). La protéine éluée a été concentrée en utilisant une colonne Vivaspin 6, 10 kDa MWCO (GE Healthcare) puis le tampon a été remplacé (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) en utilisant Bio-Scale Mini Bio-Gel-P-10 Desalting Cartridge (Bio-Rad). Pour purifier davantage la protéine, une chromatographie d'exclusion de taille a été effectuée en utilisant une colonne Superdex 200 10/300 GL (Cytiva) dans du PBS. Les fractions correspondant à la protéine d'intérêt ont été combinées et concentrées à l'aide d'Amicon Ultra Filter avec 30 kDa MWCO (Merck). La concentration de la protéine a été mesurée à l'aide d'une gamme BSA par SDS-PAGE. La protéine a été conservée dans du PBS et stockée dans l'azote liquide jusqu'à utilisation ultérieure.

### C. Essai kinase

L'essai de phosphorylation *in vitro* de la protéine Tau 1N4R par Pyk2 a été réalisé à partir d'aliqots fraîchement décongelés de protéines recombinantes. 0.1 µM de Tau et 50 nM de Pyk2 ont été brièvement mélangées et incubées dans le tampon kinase (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM dithiothréitol (DTT), 0.5 mM EDTA, pH 7.5) avec ou sans 250 µM d'ATP dans un volume final de 30 µL pendant 1h à 30°C. La réaction de phosphorylation a été interrompue par l'ajout de tampon de Laemmli (Bio-Rad #1610747) contenant 10% de β-mercaptoéthanol puis chauffée à 95°C pendant 10 minutes. La phosphorylation de Tau a été déterminée par SDS-PAGE suivi d'un Western Blot avec un anticorps spécifique de la tyrosine 18 phosphorylée de Tau.

## V. Electrophysiologie

### A. Préparation des tranches d'hippocampes

Les tranches d'hippocampes ont été préparées à partir de souris âgées de 25 à 32 jours. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale selon le protocole validé par le comité

d'éthique de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. Le cerveau a été rapidement prélevé et des tranches sagittales de 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contenant à la fois le cortex et l'hippocampe ont été coupées dans une solution de coupe à 4°C (2.5 mM de KCl, 1.25 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 234 mM de sucrose, 11 mM de glucose) avec un vibratome à lame Leica VT1200S. Les tranches ont été micro-disséquées afin d'isoler l'hippocampe puis placées dans une solution reproduisant le liquide cébrospinal, appelée aCSF (artificial cerebrospinal fluid) oxygéné (119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1.25 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.3 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 11 mM de D-glucose) saturée à 95% d' $\text{O}_2$  et 5% de  $\text{CO}_2$  à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes, puis conservées à température ambiante pendant au moins 1h avant l'enregistrement.

## B. Préparation d'oligomères $\beta$ -amyloïdes humains

Le peptide utilisé dans ces expériences a été obtenu à partir du peptide  $\text{A}\beta_{1-42}$  recombinant humain (Bachem) remis en suspension dans du 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) à 1 mM (Stine et al., 2003). Après évaporation de l'HFIP, le peptide  $\text{A}\beta$  est dilué à 1mM dans du DMSO puis à 100 mM dans de l'aCSF (119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1.25mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.3 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 11 mM de glucose). Cette solution est soniquée pendant 1h à 4°C puis vortexée pendant 24h à 4°C pour former des oligomères d' $\text{A}\beta$  ( $\text{A}\beta_0$ ).

## C. Enregistrement patch-clamp cellule entière

Pour les enregistrements en patch-clamp, des hippocampes de souris mâles et femelles ont été micro-disséqués en tranches (300 $\mu\text{m}$  d'épaisseur) et transférés dans une chambre d'enregistrement immergée et perfusée en continu à 2 mL/min avec de l'aCSF oxygéné (119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1.25mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.3 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 11 mM de glucose) à température ambiante. Les enregistrements en configuration cellules entières ont été effectués à partir du soma des neurones pyramidaux CA1 visualisés avec une caméra DIC montée sur un microscope droit avec éclairage transmis (Nikon Eclipse E600FN). Des pipettes en verre borosilicaté (5-6 M $\Omega$ ) ont été remplies d'environ 30 $\mu\text{l}$  d'une solution intracellulaire (117.5 mM de  $\text{CsMeSO}_4$ , 15.5 mM de CsCl, 10 mM de TEACl, 8 mM de NaCl, 10 mM d'HEPES, 0.25 mM d'EGTA, 4 mM de MgATP, 0.3 mM de NaGTP, 5 mM

de N-(2,6 diméthylphénylcarbamoylemethyl) bromure de triéthylammonium (QX-314) à 290 mOsm, pH 7.3). Les signaux ont été acquis à l'aide d'un double amplificateur EPC 10 (HEKA Elektronik) filtré à 2 kHz, échantillonné à 10 kHz et analysé avec le logiciel MiniAnalysis. La résistance d'entrée et la résistance d'accès au patch ont été contrôlées en permanence et les neurones qui présentaient plus de 20% de changements dans ces paramètres ont été écartés de l'étude. Le seuil d'amplitude a été fixé à 5 pA et tous les événements détectés ont été acceptés ou rejetés sur la base d'un examen visuel. Les courants analysés ont été enregistrés pendant 5 minutes après une période de stabilisation de 5 minutes. Les courants spontanés post-synaptiques excitateurs (sEPSCs) ont été enregistrés à un potentiel de membrane de -60 mV avec addition de bicuculline (10 $\mu$ M), un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, pour isoler les courants excitateurs. Lorsque mentionnée, la solution d'oligomères d'A $\beta$  a été préparée à partir du peptide humain A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Bachem) comme indiqué précédemment. Pour suivre l'évolution des courants sEPSCs, les neurones pyramidaux ont été enregistrés pendant 5 minutes (baseline) puis perfusés et enregistrés pendant 20 minutes avec la solution d'A $\beta$  à 100 nM. Pour chaque neurone, l'évolution des sEPSCs a été comparée en normalisant les 5 dernières minutes de chaque enregistrement à la valeur obtenue pendant la baseline de 5 minutes. Les courants ont été acquis avec le logiciel Patchmaster (HEKA Elektronik) et analysés avec MiniAnalysis.

#### D. Enregistrements extracellulaires

Pour les expériences de potentialisation à long-terme (LTP) dans le cadre de l'étude de la plasticité synaptique, les tranches d'hippocampes ont été transférées dans une chambre d'enregistrement submersive. L'aCSF oxygéné (119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1.25mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM de glucose) a été perfusé en continue dans la chambre (2 mL/min) à 28°C. Pour induire un potentiel postsynaptique excitateur de champ (fEPSP pour field excitatory postsynaptic potential) dans la région CA1 de l'hippocampe, une électrode de stimulation a été placée au niveau des collatérales de Schaffer et une pipette en verre borosilicaté contenant de l'aCSF fixée à une électrode d'enregistrement est insérée dans l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de CA1 situé dans le stratum radiatum. Des stimulations test ont été délivrées toutes les 15 secondes et l'intensité des stimuli a été ajustée pour produire 50% de la réponse maximale. La réponse basale (baseline) a été enregistrée pendant 15 minutes. Les LTP ont été

induites à l'aide de deux protocoles de stimulations. Le premier est le protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) et consiste en 2 stimulations à 100 Hz délivrées avec 20 secondes d'intervalle. Le deuxième protocole correspond au protocole de stimulation thêta (TBS) et se compose de 5 trains de 10 salves de 4 impulsions délivrées à 100 Hz avec un intervalle de 200 ms entre les salves et de 20 secondes entre chaque train. Les signaux ont été acquis avec un double amplificateur EPC10 (HEKA Elektronik) et analysés avec le logiciel FitMaster (HEKA Elektronik).

## VI. Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4. Les comparaisons entre deux groupes ont été évaluées à l'aide du test bilatéral de Mann-Whitney. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn a été utilisé pour les comparaisons multiples. La taille de l'échantillon pour les différents ensembles de données est mentionnée dans les légendes des figures respectives. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM à partir d'échantillons indépendants. Les niveaux de significativité graphique sont les suivants : \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  ; ns = non significatif.

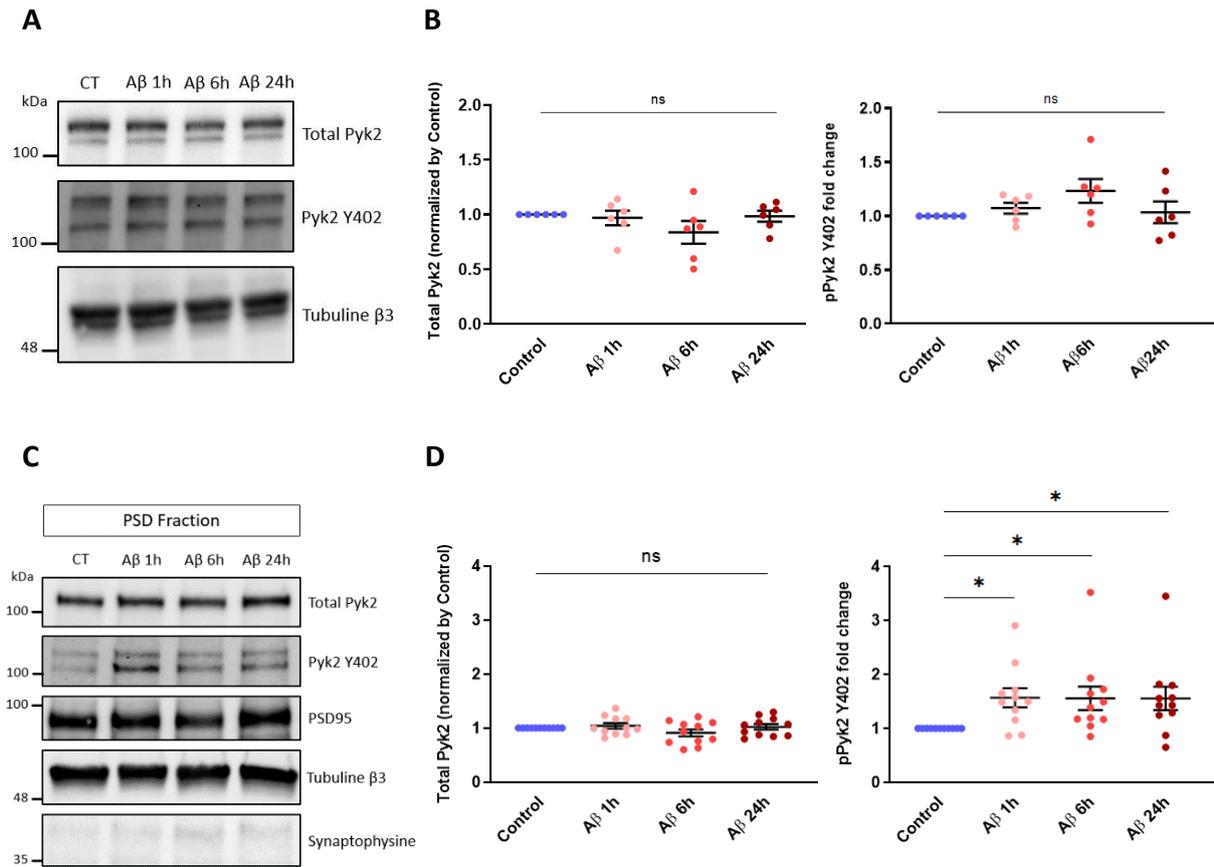
# Résultats

---

## I. Implication de Pyk2 dans la synaptotoxicité induite par les A $\beta$

### A. Les A $\beta$ induisent l'activation de Pyk2 spécifiquement au niveau post-synaptique

Comme mentionné dans l'introduction, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle de Pyk2, protecteur ou aggravateur, dans les effets neurotoxiques médiés par les formes oligomériques d'A $\beta$  (A $\beta$ ). Nous avons donc tout d'abord étudié l'effet de l'application extracellulaire d'A $\beta$  sur l'activation de Pyk2, mise en évidence par la phosphorylation de sa tyrosine 402, dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris à 14 DIV (days *in vitro*). Les neurones ont été exposés 1h, 6h et 24h à 100 nM d'A $\beta$ . Quel que soit le temps d'exposition, nous n'observons aucune modification de l'expression ou de la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2 dans un lysat total de neurones issus des cultures primaires (**Figure 1A et B**). Cependant Pyk2 a été décrite comme étant impliquée dans la plasticité synaptique (Bartos, Ulrich, Li, Beazely, Chen, MacDonald, et al. 2010). Nous nous sommes donc demandés si l'effet des A $\beta$  sur Pyk2 pouvait être localisé dans des compartiments subcellulaires des neurones. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un fractionnement cellulaire afin d'isoler la fraction post-synaptique (PSD pour Post-Synaptic Density), correspondant aux épines dendritiques, de la fraction non PSD de neurones issus de cultures primaires traités avec des A $\beta$  à 100 nM. Suite à ce traitement, on observe une augmentation de la phosphorylation sur la tyrosine 402 de Pyk2 dans la fraction PSD dès 1h de traitement (56.9%  $\pm$  17.7% d'augmentation par rapport au contrôle ; p = 0.0114) qui perdure après 6 et 24h de traitement (respectivement 55.8%  $\pm$  21.8% et 55.6%  $\pm$  21.7% d'augmentation par rapport au contrôle avec p = 0.0156 et p = 0.0165) (**Figure 1C et D**). En revanche, nous n'avons observé aucune modification de la quantité totale de Pyk2 dans cette fraction PSD démontrant un rôle des A $\beta$  dans l'activation et non la translocation de Pyk2 au niveau des épines dendritiques.



**Figure 1 : L'exposition des neurones corticaux en culture aux Aβ induit une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2 dans les synapses. A et C) Western Blot d'un lysat total (A) ou d'un fractionnement cellulaire (C) de culture primaire de neurones corticaux traités ou non avec 100 nM d'Aβ pendant 1h, 6h ou 24h. L'expression de Pyk2 totale (total Pyk2) et phosphorylée sur la tyrosine 402 (Pyk2 Y402) sont représentées. La tubuline β3 est utilisée comme contrôle de chargement des protéines. Pour (C), la PSD95 est utilisée pour confirmer l'enrichissement des protéines de caractérisation dans la fraction post-synaptique et la synaptophysine est utilisée pour caractériser l'absence des protéines de la fraction pré-synaptique ce qui signe la qualité du fractionnement. B et D) Quantification des résultats obtenus respectivement en (A) et (C). Les données ont été normalisées par la tubuline puis les conditions traitées ont été exprimées en fonction de la condition contrôle. La phosphorylation de Pyk2 a été évaluée par le ratio pPyk2 Y402 / Pyk2 totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne ± SEM. Pour (B), n = 6 cultures différentes par condition ; pour (D), n = 11 cultures différentes par condition. Tests de Kruskal-Wallis suivis d'un test post-hoc de Dunn, \* p < 0.05, ns = non significatif.**

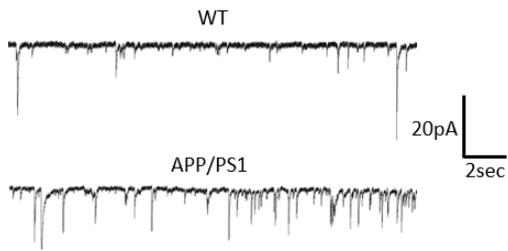
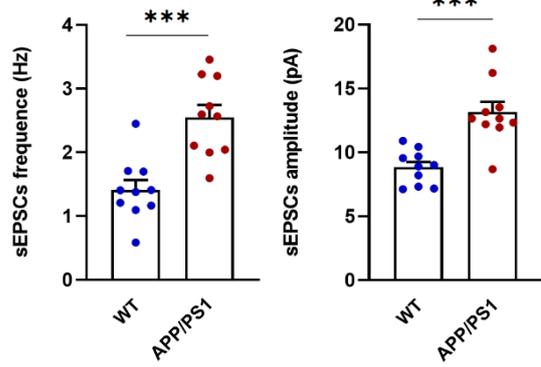
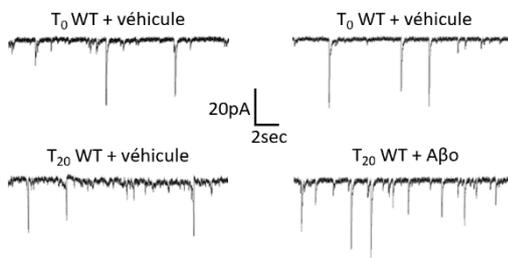
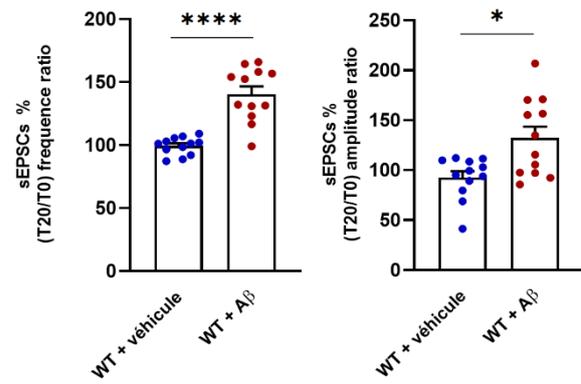
Ces résultats suggèrent que l'application extracellulaire d'Aβ sur des neurones corticaux en culture conduit à l'activation de Pyk2 localisée au niveau post-synaptique.

## B. Pyk2 médie les perturbations de la neurotransmission induites par les A $\beta$ o dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer

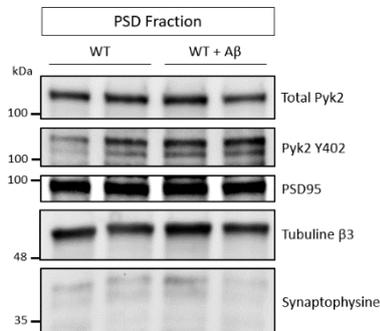
Chez les patients Alzheimer, une hyperactivité des neurones de l'hippocampe a été identifiée au cours des phases précoces de la maladie (au stade MCI) suivie par une hypoactivité cérébrale dans les stades plus tardifs (Celone et al. 2006). Cette perturbation de l'activité synaptique a également été retrouvée dans le modèle de la maladie d'Alzheimer que nous utilisons au laboratoire : la souris APP/PS1-21 avec une hyperactivité de l'hippocampe observée à 1 mois qui va laisser place à une hypoactivité à 3 mois (Paumier et al. 2022). En effet, des travaux réalisés au sein de l'équipe sur des tranches d'hippocampes ont permis de mettre évidence ce phénomène d'hyperactivité chez des souris APP/PS1-21 d'un mois et sur des souris WT après perfusion d'A $\beta$ o à 100 nM pendant 20 minutes (**Figure 2A à D**) (Bosson et al., 2017; Payet et al., abstract de la Fens 2022 - article en préparation). Pour cela, des enregistrements patch-clamp ont été effectués sur des tranches d'hippocampes de souris WT et APP/PS1-21 d'un mois, en présence de bicuculline à 10  $\mu$ M (un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>), afin d'enregistrer les courants spontanés post-synaptiques excitateurs (sEPSCs) des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. On observe une augmentation significative de la fréquence et de l'amplitude de ces courants chez les APP/PS1-21 par rapport aux WT (fréquence : 1.41 Hz  $\pm$  0.15 chez les souris WT vs 2.55  $\pm$  0.19 chez les souris APP/PS1-21,  $p = 0.0003$  ; amplitude : 8.84 pA  $\pm$  0.43 chez les souris WT vs 13.16  $\pm$  0.80 chez les souris APP/PS1-21,  $p = 0.0003$ ). Afin de confirmer l'implication des A $\beta$ o dans ces modifications de la neurotransmission excitatrice, l'évolution des courants excitateurs a été mesurée en présence de 100 nM d'A $\beta$ o au cours de cinétiques de 20 minutes réalisées chez des souris WT d'un mois. Cette évolution est représentée par le rapport  $T_{20}/T_0$ ,  $T_0$  correspondant à l'activité excitatrice enregistrée pendant 5 minutes sans traitement A $\beta$ o, et  $T_{20}$  représentant l'activité obtenue après 20 minutes de traitement. Suite à l'application extracellulaire d'A $\beta$ o sur des tranches d'hippocampes de souris WT, nous observons des effets similaires à ceux observés chez les souris APP/PS1-21, à savoir une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des courants excitateurs (ratio fréquence  $T_{20}/T_0$  : 99.3% Hz  $\pm$  2.0% chez les souris WT vs 140.4%  $\pm$  6.1% chez les souris APP/PS1-21,  $p < 0.0001$  ; ratio amplitude  $T_{20}/T_0$  : 92.8%  $\pm$  6.0% chez les souris WT vs 132.4%  $\pm$  11.3% chez les souris APP/PS1-21,  $p = 0.0242$ ).

Des études ont révélé que l'hyperactivité induite par les A $\beta$ o conduit à une accumulation de glutamate dans la fente synaptique entraînant la sur-activation des récepteurs NMDA et

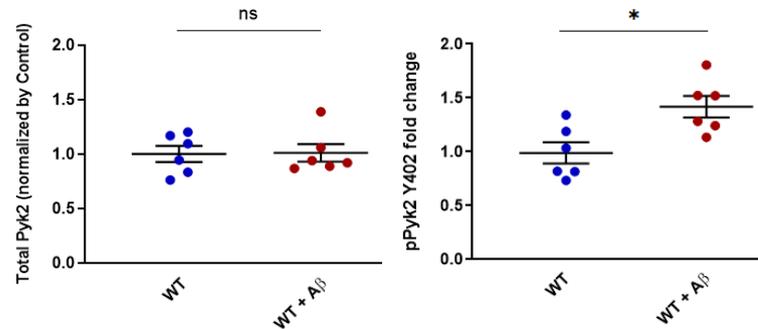
l'augmentation subséquente de calcium intracellulaire qui pourrait être responsable de phénomènes synaptotoxiques (Ferreira et al. 2015; Zott et al. 2019). Dans ce contexte, puisque Pyk2 est une tyrosine kinase capable d'augmenter la réponse des récepteurs NMDA (Y. Huang et al. 2001), nous avons voulu tester l'implication de Pyk2 dans l'hyperactivité hippocampique médiée par les A $\beta$ . Pour ce faire, nous avons tout d'abord évalué l'état de phosphorylation de Pyk2 dans les épines dendritiques lorsque les neurones de l'hippocampe sont, comme lors des expériences de patch-clamp, perfusés pendant 20 minutes avec des A $\beta$ . Nous avons réalisé des fractionnements cellulaires de tranches d'hippocampes de souris WT d'un mois, traitées ou non avec des A $\beta$  (**Figure 2E et F**). Après 20 minutes de traitement, on observe une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2 dans la fraction PSD ( $0.99 \pm 0.10$  chez les WT contre  $1.42 \pm 0.10$  chez les WT traitées avec des A $\beta$  ;  $p = 0.026$ ). Ainsi, lorsque les neurones de l'hippocampe sont hyperactivés suite à un traitement par des A $\beta$ , la phosphorylation de la tyrosine 402 de Pyk2 est augmentée de manière concomitante. Nous avons donc testé l'implication directe de Pyk2 dans ce phénomène d'hyperactivité en reproduisant les expériences de patch-clamp précédentes chez des souris Pyk2 KO d'un mois (**Figure 2G et H**). Plus aucune différence de fréquence et d'amplitude n'a été observée entre les tranches d'hippocampes de souris Pyk2 KO traitées ou non avec 100 nM d'A $\beta$ . L'absence de Pyk2 semble donc prévenir l'hyperactivité des neurones de l'hippocampe induite par les A $\beta$  démontrant ainsi un rôle de Pyk2 dans ce phénomène d'hyperactivité.

**A** 1 month**B** 1 month**C** 1 month**D** 1 month**E**

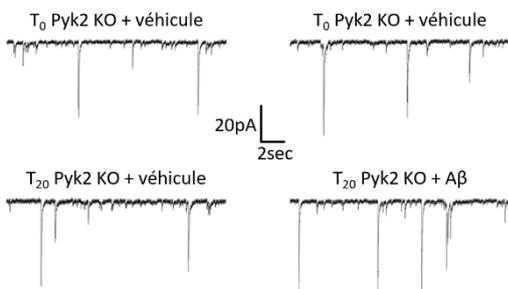
1 month

**F**

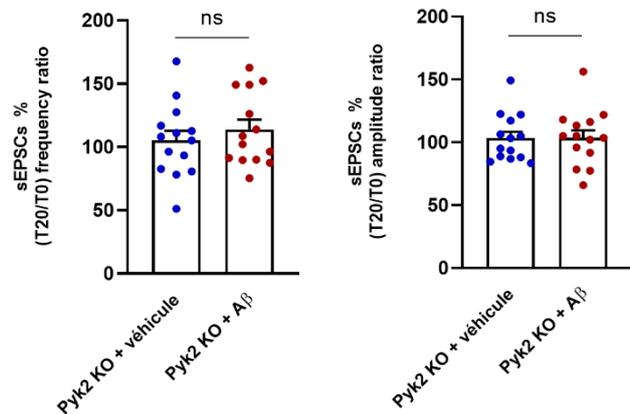
1 month

**G**

1 month

**H**

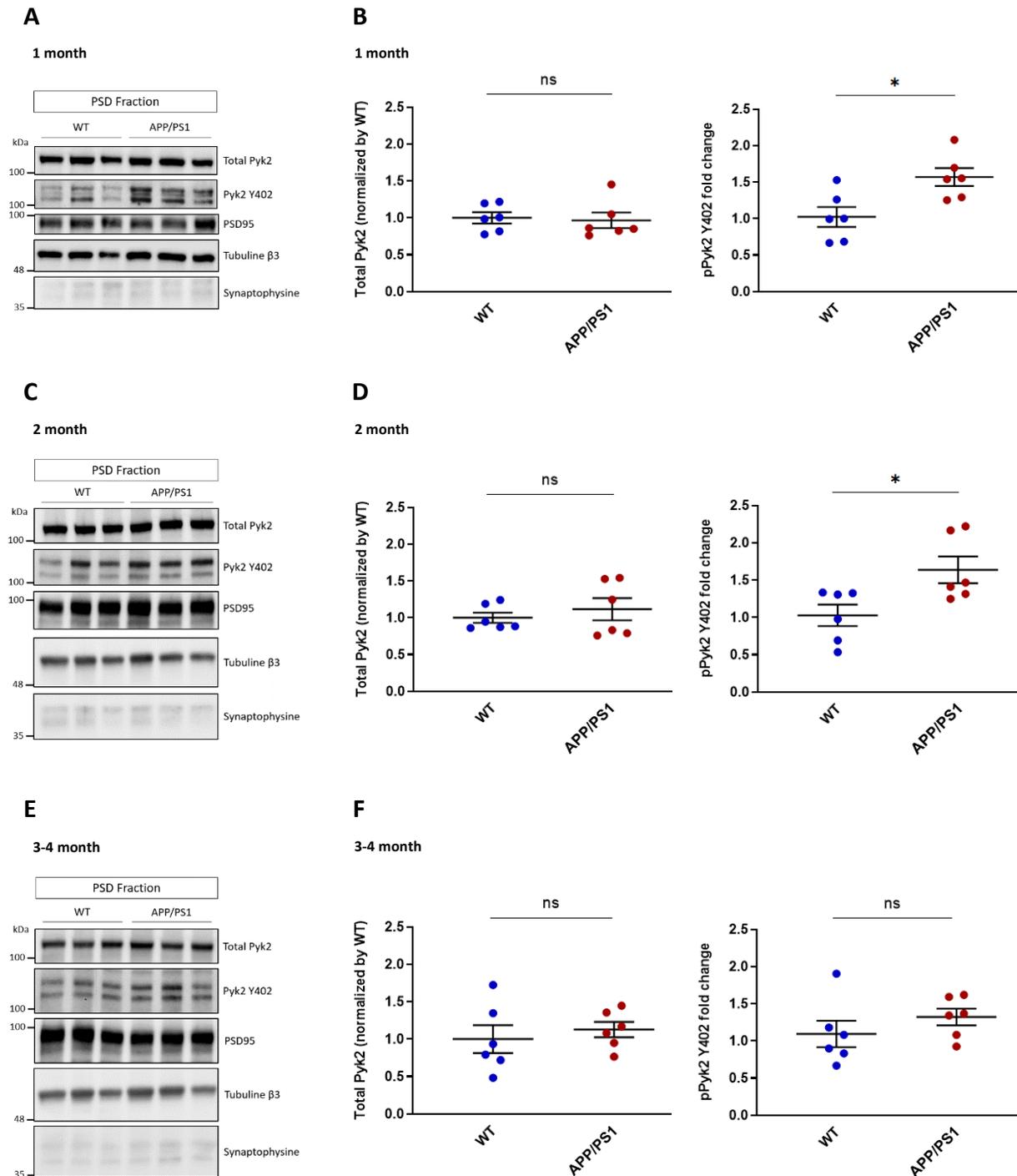
1 month



**Figure 2 : Pyk2 est impliquée dans l'hyperactivité des neurones hippocampiques induite par les A $\beta$ .** **A)** Traces représentatives des courants spontanés excitateurs (sEPSCs) enregistrés en mode cellule entière, sur des neurones hippocampiques clampés à -60 mV chez des souris WT et APP/PS1-21 d'un mois, en présence de 10  $\mu$ M de bicuculline. **B)** Histogrammes représentant la fréquence et l'amplitude des sEPSCs enregistrés dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe chez les souris WT et APP/PS1-21 d'un mois (n = 10 neurones de 5 souris WT ou APP/PS1-21). Tests de Mann-Whitney, \*\*\* p < 0.001. **C)** Traces représentatives des courants spontanés excitateurs (sEPSCs) enregistrés en mode cellule entière, sur des neurones hippocampiques clampés à -60 mV chez des souris WT d'un mois, en présence de 10  $\mu$ M de bicuculline. Les traces ont été extraites au début de l'expérience (T<sub>0</sub> WT + véhicule) et 20 min après (T<sub>20</sub> WT + véhicule ou WT + A $\beta$ , respectivement panneau de gauche et de droite). **D)** Histogrammes représentant la fréquence et l'amplitude des sEPSCs enregistrés dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe chez les souris WT d'un mois traitées ou non avec 100 nM d'A $\beta$  pendant 20 min (n = 12 neurones par condition de 5 souris WT). La fréquence et l'amplitude sont exprimées en ratio de la valeur à 20 min (T<sub>20</sub>) / la valeur au début de l'enregistrement (T<sub>0</sub>). Tests de Mann-Whitney, \* p < 0.05, \*\*\*\* p < 0.0001. **E)** Western Blot d'un fractionnement cellulaire de tranches d'hippocampes de souris WT d'un mois traitées ou non avec 100 nM d'A $\beta$  pendant 20 min. L'expression de Pyk2 totale (total Pyk2) et phosphorylée sur la tyrosine 402 (Pyk2 Y402) sont représentées. La tubuline  $\beta$ 3 est utilisée comme contrôle de charge protéique. La PSD95 est utilisée pour confirmer l'enrichissement des protéines de caractérisation dans la fraction post-synaptique et la synaptophysine est utilisée pour caractériser l'absence des protéines de la fraction pré-synaptique ce qui signe la qualité du fractionnement. **F)** Quantification des résultats obtenus en (E). Les données ont été normalisées par la tubuline puis la condition traitée (WT + A $\beta$ ) a été exprimée en fonction de la condition contrôle (WT). La phosphorylation de Pyk2 a été évaluée par le ratio pPyk2 Y402 / Pyk2 totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 souris WT par condition). Tests de Mann-Whitney, \* p < 0.05, ns = non significatif. **G)** Traces représentatives des courants spontanés excitateurs (sEPSCs) enregistrés en mode cellule entière, sur des neurones hippocampiques clampés à -60 mV chez des souris Pyk2 KO d'un mois, en présence de 10  $\mu$ M de bicuculline. Les traces ont été extraites au début de l'expérience (T<sub>0</sub> Pyk2 KO + véhicule) et 20 min après (T<sub>20</sub> Pyk2 KO + véhicule ou Pyk2 KO + A $\beta$ , respectivement panneau de gauche et de droite). **H)** Histogrammes représentant la fréquence et l'amplitude des sEPSCs enregistrés dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe chez les souris Pyk2 KO d'un mois traitées ou non avec 100 nM d'A $\beta$  pendant 20 min (n = 14 neurones par condition de 5 souris Pyk2 KO). La fréquence et l'amplitude sont exprimées en ratio de la valeur à 20 min (T<sub>20</sub>) / la valeur au début de l'enregistrement (T<sub>0</sub>). Tests de Mann-Whitney, ns = non significatif.

Comme mentionné précédemment, les travaux réalisés au sein de l'équipe ont montré une évolution progressive de cette hyperactivité précoce observée à un mois chez les souris APP/PS1-21 vers une hypoactivité à 3 mois (Paumier et al. 2022). Du fait de nos résultats

indiquant un rôle de Pyk2 dans l'hyperactivité hippocampique, nous nous sommes interrogés sur son implication au cours de cette transition d'hyper- vers hypoactivité hippocampique. Nous avons donc réalisé des fractionnements cellulaires d'hippocampes de souris WT et APP/PS1-21 à 1, 2 et 3-4 mois afin d'étudier l'évolution de l'expression et de l'état de phosphorylation de Pyk2 dans les épines dendritiques au cours de ce changement d'activité synaptique entre 1 et 3 mois (**Figure 3**). Aucune différence d'expression de Pyk2 n'a été détectée. En revanche, on observe une phosphorylation de Pyk2 significativement plus importante dans la fraction PSD des souris APP/PS1-21 d'un mois ( $1.02 \pm 0.14$  chez les souris WT vs  $1.57 \pm 0.12$  chez les souris APP/PS1-21 ;  $p = 0.0152$ ) et de 2 mois ( $1.03 \pm 0.14$  chez les souris WT contre  $1.64 \pm 0.18$  chez les souris APP/PS1-21 ;  $p = 0.0411$ ) par rapport aux souris WT, qui n'est plus présente chez les souris APP/PS1-21 de 3-4 mois. Ainsi, il semblerait qu'au cours de la transition entre une hyper- vers une hypoactivité des neurones de l'hippocampe dans notre modèle de souris Alzheimer, on observe simultanément une phosphorylation plus importante de Pyk2 dans les épines dendritiques des souris APP/PS1-21 d'un mois qui retourne à un niveau comparable aux souris WT à 3 mois.



**Figure 3 : L'activation de Pyk2 suit le niveau d'activité des neurones CA1 de l'hippocampe chez les souris APP/PS1-21. A, C et E) Western Blot d'un fractionnement cellulaire d'hippocampes de souris WT et APP/PS1-21 d'un mois (A), de 2 mois (C) et de 3-4 mois (E). L'expression de Pyk2 totale (total Pyk2) et phosphorylée sur la tyrosine 402 (Pyk2 Y402) sont représentées. La tubuline  $\beta$ 3 est utilisée comme contrôle de chargement. Pour (C), la PSD95 est utilisée pour confirmer l'enrichissement des protéines de caractérisation dans la fraction post-synaptique et la synaptophysine est utilisée pour caractériser l'absence des protéines de la fraction pré-synaptique ce qui signe la qualité du fractionnement. B, D et F) Quantification des résultats obtenus respectivement en (A), (C) et (E). La quantification a été réalisée**

seulement sur la fraction PSD. Les données ont été normalisées par la tubuline puis la condition APP/PS1-21 a été exprimée en fonction de la condition WT. La phosphorylation de Pyk2 a été évaluée par le ratio pPyk2 Y402 / Pyk2 totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 souris par groupe). Tests de Mann-Whitney, \* p < 0.05, ns = non significatif.

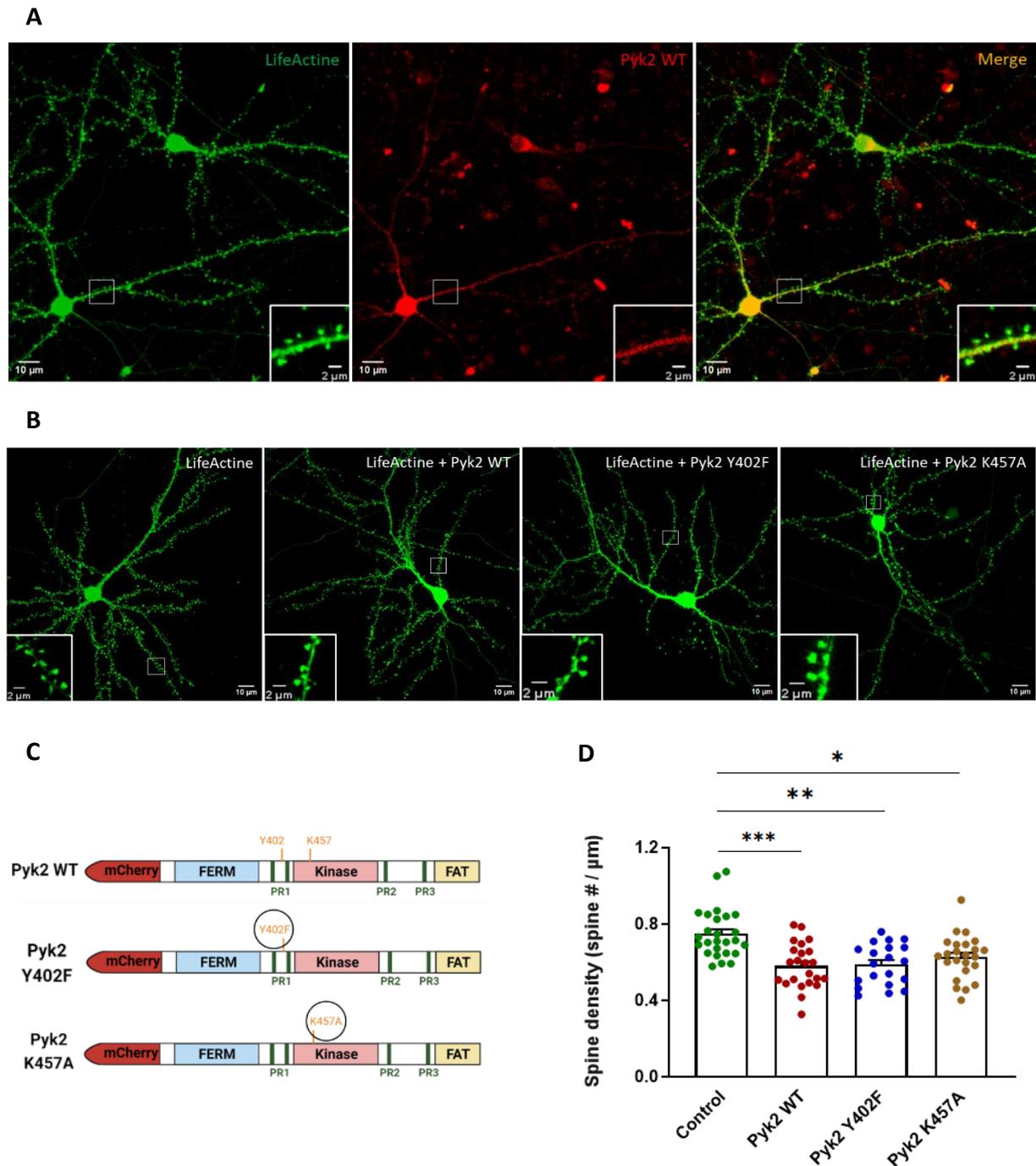
Nous avons donc montré que les oligomères d'A $\beta$  sont capables d'induire la phosphorylation de Pyk2 sur sa tyrosine 402 au niveau synaptique. Il est intéressant de noter que cette modification de phosphorylation ne semble observable que dans la fraction PSD positive correspondant au compartiment post-synaptique des synapses excitatrices. En effet, nous avons également exploré l'expression et la phosphorylation de Pyk2 dans des lysats totaux de cortex et d'hippocampes de souris APP/PS1-21 à différents âges, allant de 1 à 12 mois (**Figure Annexe 1**). Nous n'avons observé aucune différence d'expression ou de phosphorylation de Pyk2 dans l'hippocampe de souris APP/PS1-21 par rapport aux souris WT à 1, 3, 6, 9 et 12 mois. En revanche, au niveau cortical, les modifications d'expression et/ou de phosphorylation de Pyk2 des souris APP/PS1-21 ne semblent pas suivre un modèle précis. Ainsi, les variabilités d'expression de Pyk2 observées dans le parenchyme cérébral ne permettent pas de conclure sur l'importance fonctionnelle de ces observations.

Nous avons également montré l'implication de Pyk2 dans l'hyperactivité de l'hippocampe induite par les A $\beta$  observée dans les phases précoces d'un modèle de souris Alzheimer. Ce phénomène d'hyperactivité est accompagné d'une augmentation de la phosphorylation de Pyk2 sur la tyrosine 402 qui semble décroître en même temps que l'on passe d'un état d'hyperactivité à un état d'hypoactivité des neurones de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent une implication de Pyk2 dans la synaptotoxicité induite par les A $\beta$  qui pourrait être dépendante de son activation. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de Pyk2 dans les atteintes synaptiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

### C. La surexpression de Pyk2 entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques via son domaine PR1

Afin d'étudier l'implication de Pyk2 dans les perturbations synaptiques, notamment la perte d'épines dendritiques observée dans la maladie d'Alzheimer, nous avons tout d'abord étudié son rôle sur la densité des épines dendritiques dans des cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris. Pour cela, des plasmides codant pour différentes protéines

couplées à un fluorophore ont été transfectés dans les neurones en culture. Nous avons notamment utilisé un plasmide afin de surexprimer la LifeActine couplée à la GFP qui permet de marquer les filaments d'actine dans le but d'observer les épines dendritiques en microscopie confocale sans modifier le ratio entre l'actine globulaire et l'actine filamentaire (**Figure 4A**) (Riedl et al. 2008). Etant donné l'implication de Pyk2 dans l'hyperactivité hippocampique qui pourrait être liée à une augmentation de sa phosphorylation et/ou de son activité, nous avons surexprimé la protéine Pyk2 (Pyk2 WT) et deux mutants : l'un contenant une mutation sur son site de trans-autophosphorylation (Pyk2 Y402F) empêchant la phosphorylation et donc l'activation de Pyk2, et l'autre contenant une mutation au sein de son domaine kinase (Pyk2 K457A) supprimant son activité kinasique (**Figure 4B et C**). Lorsque l'on surexprime Pyk2 WT, on observe une distribution ubiquitaire de Pyk2 (**Figure 4A**). On le retrouve majoritairement au niveau du corps cellulaire mais également dans les neurites et les épines dendritiques. Ici, seul Pyk2 WT est représenté mais les autres mutants de Pyk2 utilisés dans cette étude ont une distribution similaire (**Figure Annexe 2**).

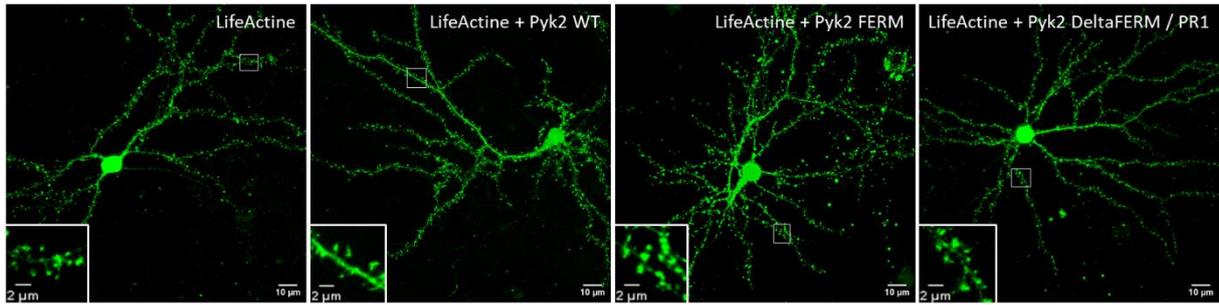
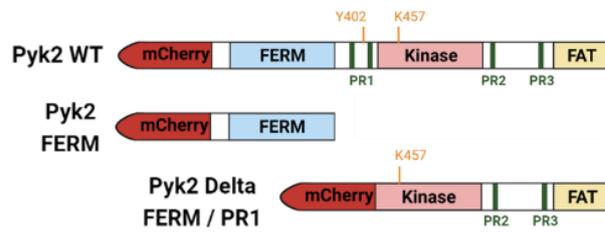
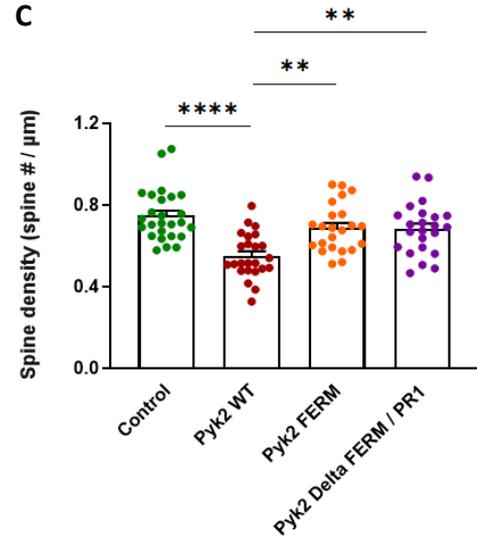
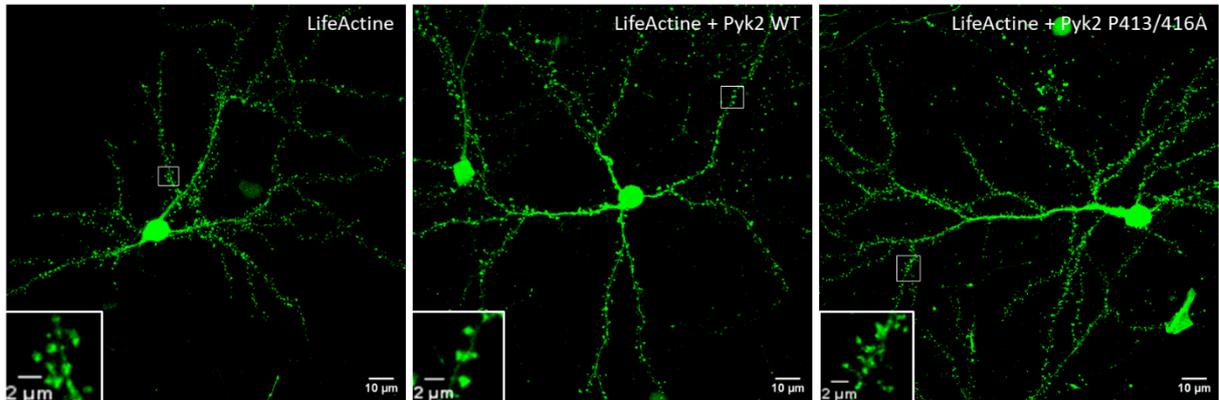
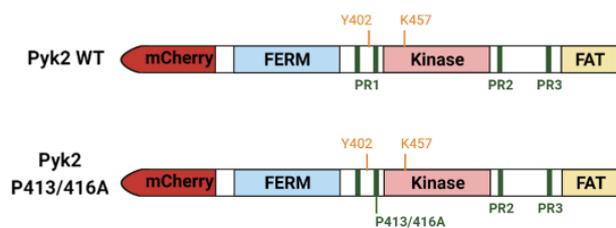
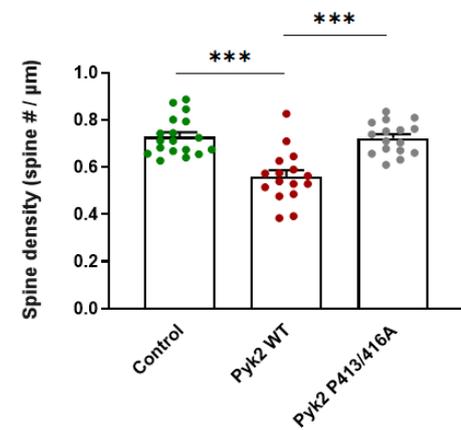


**Figure 4 : La surexpression de Pyk2 dans des neurones corticaux en culture diminue la densité des épines dendritiques indépendamment de son activation ou de son activité kinase. A) Images confocales d'un neurone cortical d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec la LifeActine-GFP (LA-GFP en vert) et mCherry-Pyk2 WT (en rouge) à 13 DIV puis imagés 48h après transfection. Barre d'échelle = 10  $\mu$ m. Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2  $\mu$ m). B) Images confocales représentatives de neurones corticaux en culture surexprimant la LA-GFP et mCherry-Pyk2 WT, Y402F ou K457A. Seules les images avec la LA-GFP surexprimée sont représentées. Barre d'échelle = 10  $\mu$ m. Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2  $\mu$ m). C) Schéma des mutants de Pyk2 utilisés en (B). Les cercles représentent les mutations au sein de la séquence de Pyk2 (Y402F et K457A). D) Quantification de la densité des épines**

dendritiques des neurones transfectés dans les mêmes conditions qu'en (B). La condition « control » correspond aux neurones transfectés seulement avec la LA-GFP. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (Control, n = 26 ; Pyk2 WT, n = 23 ; Pyk2 Y402F, n = 20 ; Pyk2 K457A, n = 24 neurones d'au moins 6 cultures différentes). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

Lorsque les neurones surexpriment Pyk2 WT, on observe une diminution de la densité des épines par rapport aux contrôles (0.75 épines/ $\mu$ m  $\pm$  0.02 chez les contrôles contre 0.58 épines/ $\mu$ m  $\pm$  0.03 pour les neurones surexprimant Pyk2 WT ; p = 0.0003) (**Figure 4D**). Cette même diminution par rapport aux contrôles est retrouvée lorsque les neurones sont transfectés avec Pyk2 Y402F ou K457A (0.75 épines/ $\mu$ m  $\pm$  0.02 chez les contrôles vs 0.59 épines/ $\mu$ m  $\pm$  0.02 pour les neurones surexprimant Pyk2 Y402F et 0.63 épines/ $\mu$ m  $\pm$  0.02 pour les neurones surexprimant Pyk2 K457A ; respectivement p = 0.0012 et p = 0.0130). En revanche, nous n'observons aucune différence entre les neurones transfectés avec le plasmide codant pour Pyk2 WT ou l'une ou l'autre de ses mutations. Ainsi, la surexpression de Pyk2 conduit à une diminution de la densité des épines dendritiques qui semble indépendante de son activation ou de son activité kinasique.

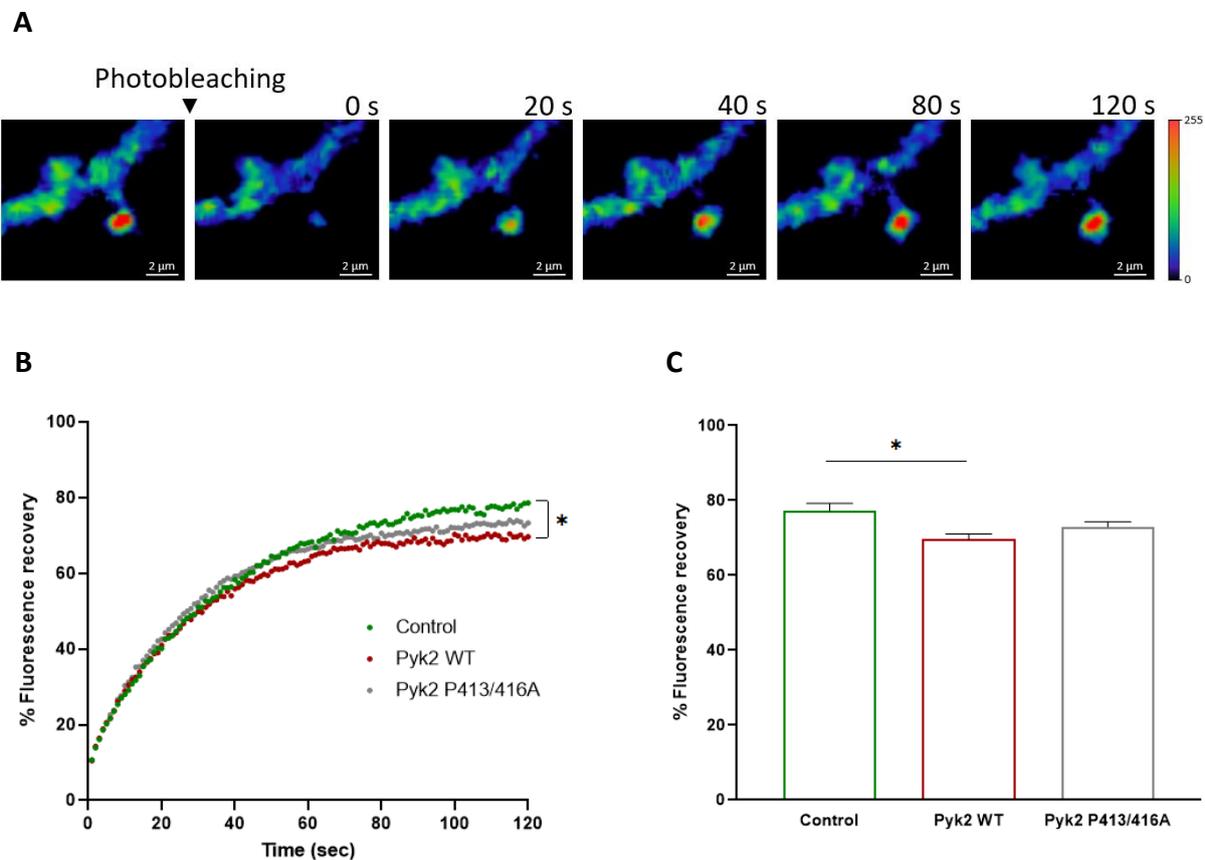
Nous nous sommes ensuite intéressés aux différents domaines de Pyk2 qui pourraient être impliqués dans cette altération de la densité des épines, notamment via des interactions avec diverses autres protéines. Pour cela, nous avons transfecté des formes tronquées de Pyk2 : l'une contenant uniquement le domaine FERM de Pyk2 (Pyk2 FERM) et l'autre manquant ce domaine FERM ainsi que la région contenant le domaine riche en proline 1 de Pyk2 et son site de trans-autophosphorylation Y402 (Pyk2 Delta FERM / PR1) (**Figure 5A et B**).

**A****B****C****D****E****F**

**Figure 5 : La surexpression de Pyk2 conduit à une diminution de la densité des épines dendritiques via son domaine PR1. A)** Images confocales représentatives de neurones corticaux d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec la LA-GFP et mCherry-Pyk2 WT, Pyk2 FERM ou Pyk2 Delta FERM/ PR1. Seules les images avec la LA-GFP surexprimée sont représentées. Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ . Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2  $\mu\text{m}$ ). **B)** Schéma des formes tronquées de Pyk2 utilisées en (A). **C)** Quantification de la densité des épines dendritiques des neurones transfectés dans les mêmes conditions qu'en (A). La condition « control » correspond aux neurones transfectés seulement avec la LA-GFP. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (Control, n = 26 ; Pyk2 WT, n = 24 ; Pyk2 FERM, n = 23 ; Pyk2 Delta FERM / PR1, n = 23 neurones d'au moins 6 cultures différentes). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001. **D)** Images confocales représentatives de neurones corticaux d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec la LA-GFP et mCherry-Pyk2 WT ou Pyk2 P413/416A. Seules les images avec la LA-GFP surexprimée sont représentées. Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ . Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2  $\mu\text{m}$ ). **E)** Schéma des formes de Pyk2 utilisées en (D). **F)** Quantification de la densité des épines dendritiques des neurones transfectés dans les mêmes conditions qu'en (D). La condition « control » correspond aux neurones transfectés seulement avec la LA-GFP. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (Control, n = 18 ; Pyk2 WT, n = 16 ; Pyk2 P413/416A, n = 16 neurones d'au moins 5 cultures différentes). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, \*\*\* p < 0.001.

Lorsque les neurones surexpriment l'une ou l'autre des formes tronquées, on observe une augmentation de la densité des épines dendritiques par rapport aux neurones transfectés avec Pyk2 WT qui atteint un niveau similaire aux contrôles (0.75 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.02 pour les contrôles contre 0.55 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.02 dans les neurones surexprimant Pyk2 WT, p < 0.0001 ; 0.69 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.02 et 0.68 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.03 dans les neurones transfectés respectivement avec Pyk2 FERM et Delta FERM / PR1, avec p = 0.0047 et p = 0.0069 par rapport aux neurones surexprimant Pyk2 WT) (**Figure 5C**). Il semblerait donc que la région de Pyk2 impliquée dans la diminution de la densité des épines ne soit présente dans aucune de ces formes tronquées. Etant donné que le seul domaine manquant est le domaine PR1, nous avons utilisé un plasmide codant pour Pyk2 mutée sur deux de ces prolines au sein de ce domaine PR1, à savoir les prolines 413 et 416 (Pyk2 P413/416A) (**Figure 5D et E**). Lorsque les neurones surexpriment le mutant proline de Pyk2, on observe une densité des épines significativement plus élevée que les neurones transfectés avec Pyk2 WT (0.72 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.02 pour les neurones surexprimant Pyk2 413/416A contre 0.56 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.03 dans les neurones transfectés avec Pyk2 WT, p = 0.0002) qui est comparable avec ce que l'on peut observer dans les neurones contrôles (0.73 épines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  0.02, p = 0.0001 par rapport aux neurones surexprimant Pyk2 WT).

Nous avons donc montré qu'une surexpression de Pyk2 entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques via son domaine PR1. Or, les motifs riches en proline sont souvent impliqués dans les interactions protéine-protéine. De plus, des études ont mis en évidence un rôle de Pyk2 dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans d'autres types cellulaires que les neurones (Q. Wang et al. 2003). Nous nous sommes donc demandés si l'effet observé sur cette densité était médié par une interaction de Pyk2 avec l'actine et/ou des protéines régulant sa dynamique. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) qui consistent à photoblanchir l'actine d'une épine dendritique puis évaluer la récupération de la fluorescence correspondant à sa dynamique (**Figure 6**).

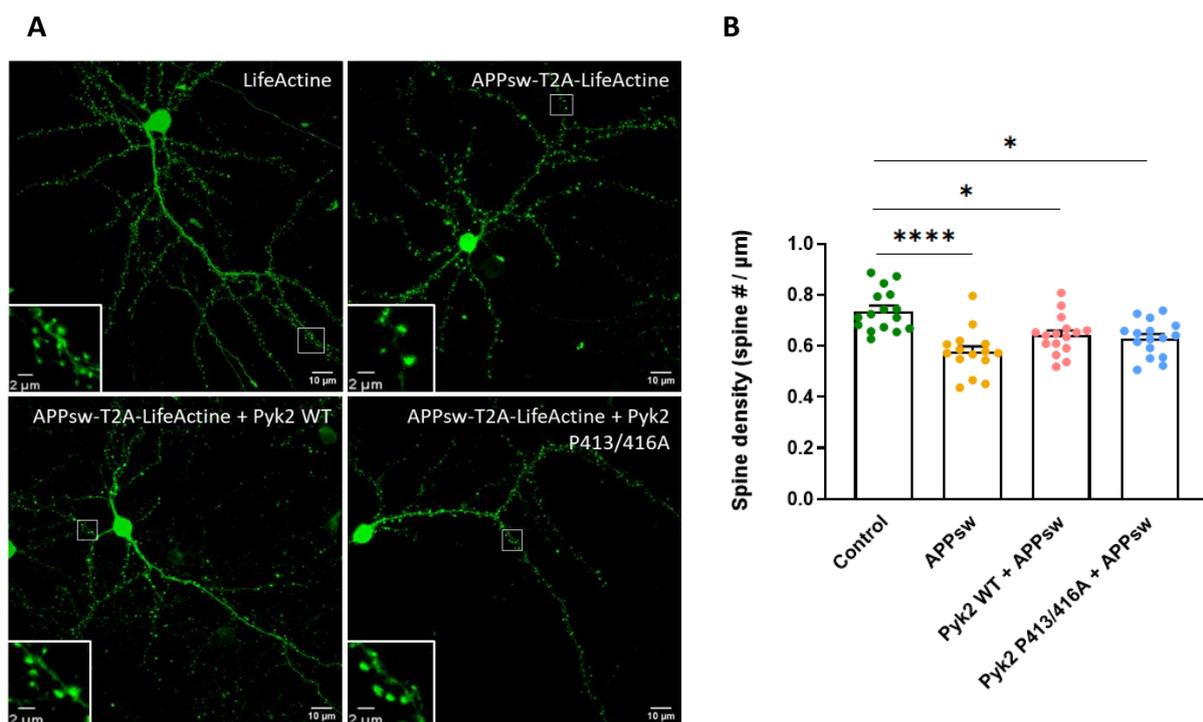


**Figure 6 : La surexpression de Pyk2 WT induit une stabilisation de l'actine dans les épines. A)** Images confocales représentatives de l'évolution de l'intensité de fluorescence de l'Actine-GFP d'une épine dendritique après photoblanchiment ( $t = 0$  seconde) dans un neurone transfecté avec de l'Actine-GFP. L'intensité de fluorescence est exprimée en niveau de gris, la couleur rouge correspondant à l'intensité de fluorescence la plus importante. Barre d'échelle =  $2 \mu\text{m}$ . **B)** Courbes représentatives de la récupération de la fluorescence de l'Actine-GFP au cours du temps après photoblanchiment des épines de neurones transfectés avec l'Actine-GFP et mCherry-Pyk2 WT ou P413/416A. **C)** Quantification des conditions en (B). Seules les 20 dernières secondes ont été prises en compte pour calculer le pourcentage de récupération de

la fluorescence de l'Actine-GFP. La condition « control » correspond aux neurones transfectés seulement avec l'Actine-GFP. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (Control, n = 59 épines provenant de 14 neurones de 6 cultures différentes ; Pyk2 WT, n = 74 épines provenant de 14 neurones de 6 cultures différentes ; Pyk2 P413/416A, n = 75 épines provenant de 11 neurones de 5 cultures différentes). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, \* p < 0.05.

Lorsque les neurones surexpriment Pyk2 WT, on observe une légère stabilisation de l'actine par rapport aux neurones contrôles ( $77.2\% \pm 2.0$  en condition contrôle contre  $69.6\% \pm 1.5$  pour les neurones transfectés avec Pyk2 WT, p = 0.0236). En revanche, lorsque les neurones surexpriment le mutant proline de Pyk2, on observe un renouvellement de l'actine qui se situe entre celui des neurones contrôles et ceux surexprimant Pyk2 WT ( $73.0\% \pm 1.3$ ). La surexpression de Pyk2 semble donc entraîner une stabilisation partielle de l'actine. Cette dérégulation de sa dynamique pourrait perturber le maintien des structures synaptiques et ainsi participer à la diminution de la densité des épines observée lorsque l'on surexprime Pyk2.

Puisque la surexpression de Pyk2 induit une diminution de la densité des épines dendritiques, nous nous sommes interrogés sur son implication dans les effets synaptiques induits par une accumulation intraneuronale d'A $\beta$ o humains. Pour ce faire, nous avons transfecté des neurones corticaux en culture avec un plasmide codant pour l'APP Swedish humaine (APPsw) qui entraîne une surproduction d'A $\beta$  dans les neurones (**Figure 7**). Lorsque les neurones surexpriment l'APPsw, on observe une diminution de la densité des épines par rapport aux contrôles ( $0.74$  épines/ $\mu\text{m} \pm 0.02$  chez les contrôles contre  $0.58$  épines/ $\mu\text{m} \pm 0.02$  pour les neurones transfectés avec l'APPsw ; p < 0.0001). On observe cette même diminution lorsque les neurones sont cotransfectés avec l'APPsw et Pyk2 WT ou mutée dans son domaine PR1 ( $0.64$  épines/ $\mu\text{m} \pm 0.02$  et  $0.63$  épines/ $\mu\text{m} \pm 0.02$  pour les neurones surexprimant respectivement l'APPsw et Pyk2 WT, et l'APPsw et Pyk2 P413/416A avec p = 0.0275 et p = 0.0103 par rapport aux contrôles). En revanche, aucune différence n'a été observée entre les neurones transfectés avec l'APPsw seul et les neurones surexprimant à la fois l'APPsw et Pyk2 WT ou P413/416A. Ainsi, la surexpression de Pyk2, tout comme la surexpression d'APPsw, entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques. L'absence d'impact du mutant proline de Pyk2 sur l'effet de la surexpression de l'APPsw suggère que ces deux protéines pourraient agir sur la densité des épines dendritiques via des voies distinctes. Cependant, l'absence d'effet cumulatif de l'APPsw et Pyk2 WT nous laisse penser que ces deux protéines pourraient agir sur cette densité via des voies distinctes mais sur des cibles communes.



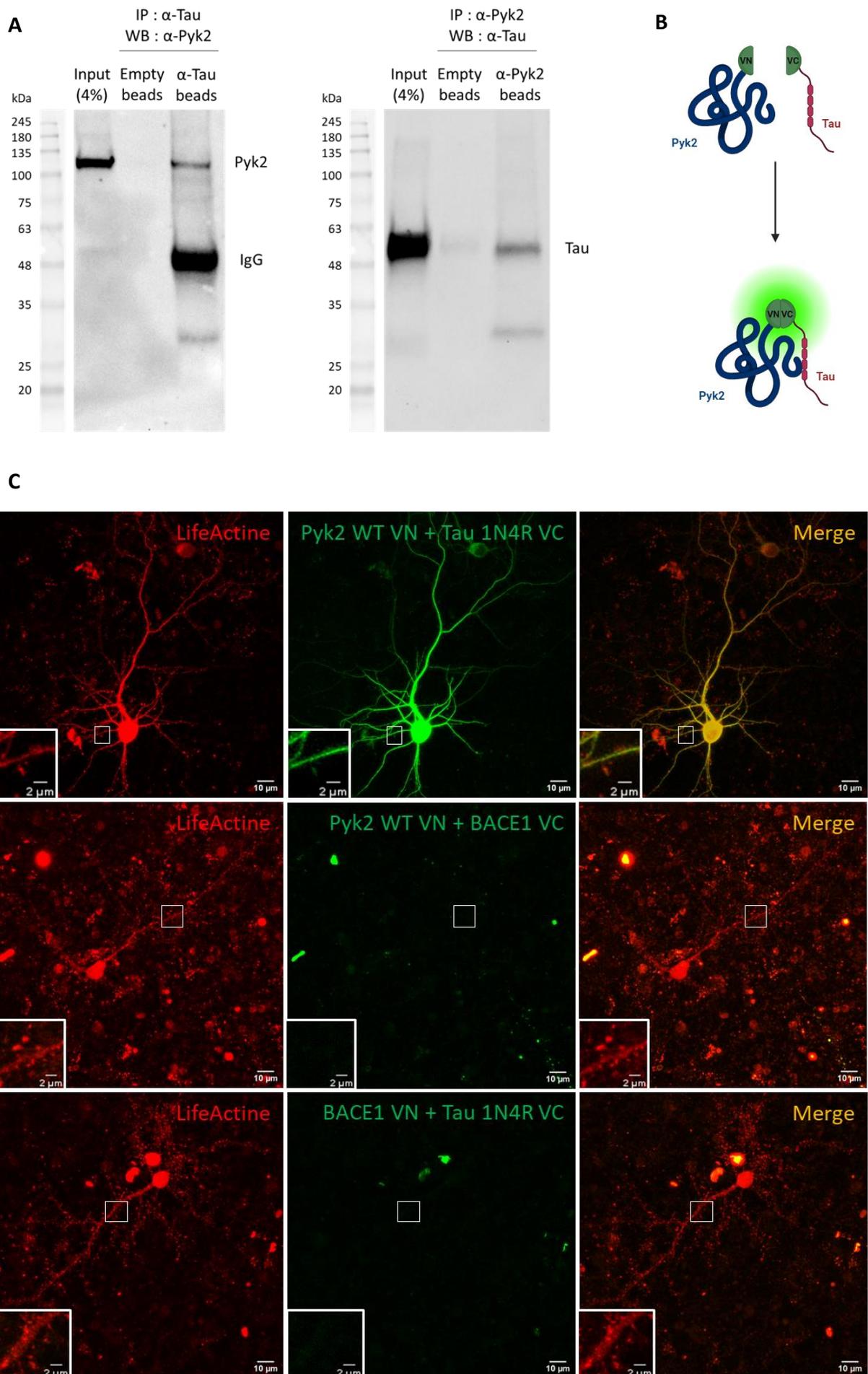
**Figure 7 : La surexpression de Pyk2 n'aggrave pas le phénotype synaptique induit par l'APPsw. A)** Images confocales représentatives de neurones corticaux d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec la LA-GFP ou l'APPsw-GFP-T2A-LA-GFP avec ou sans le plasmide codant pour mCherry-Pyk2 WT ou P413/416A. Seules les images avec la LA-GFP ou l'APPsw-GFP-T2A-LA-GFP surexprimée sont représentées. Barre d'échelle = 10 μm. Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2 μm). **B)** Quantification de la densité des épines dendritiques des neurones transfectés dans les mêmes conditions qu'en (A). La condition « control » correspond aux neurones transfectés seulement avec la LA-GFP. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne ± SEM (Control, n = 16 ; APPsw, n = 15 ; Pyk2 WT + APPsw, n = 16 ; Pyk2 P413/416A + APPsw, n = 16 neurones d'au moins 4 cultures différentes). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, \* p < 0.05, \*\*\*\* p < 0.0001.

Nous avons donc montré qu'une surexpression de Pyk2 entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques indépendamment de son activation et de son activité kinase. Cet effet semble davantage lié au domaine PR1 de Pyk2, potentiellement via des interactions avec d'autres protéines. Ce domaine serait notamment impliqué, en partie, dans la régulation de la dynamique de l'actine, essentielle pour le maintien des structures synaptiques. Parmi les protéines partenaires de Pyk2, on trouve également la protéine Tau, une protéine impliquée dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Nous nous sommes donc intéressés aux liens existants entre ces deux protéines.

## II. Pyk2 : une tyrosine kinase de Tau impliquée dans sa localisation synaptique

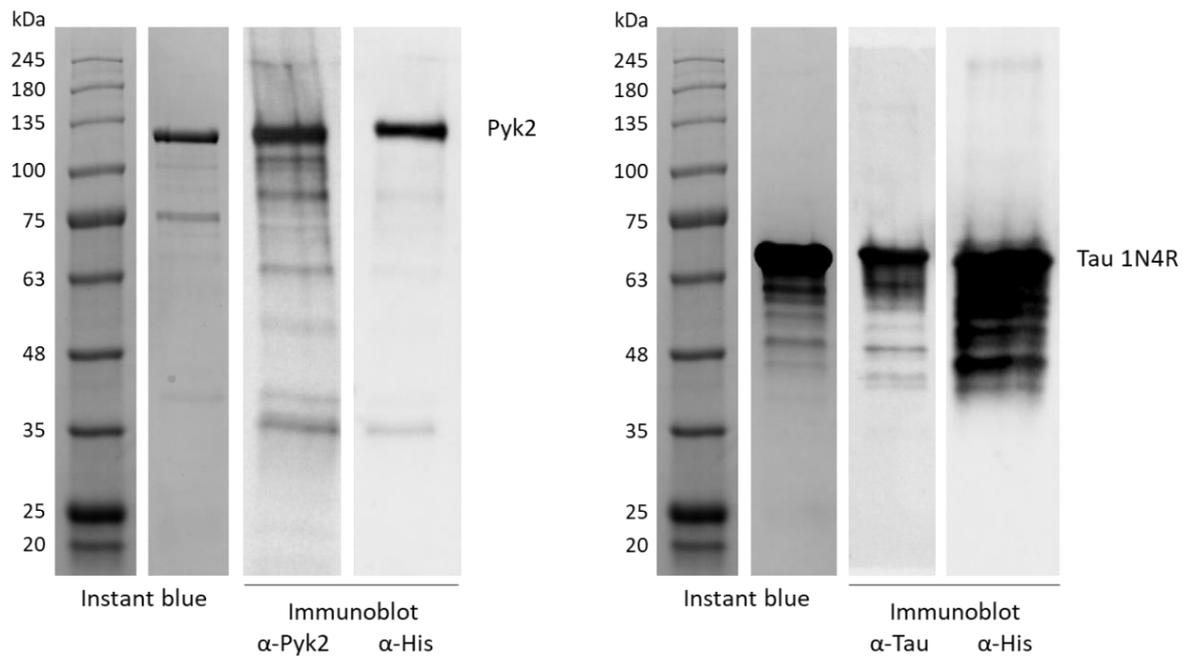
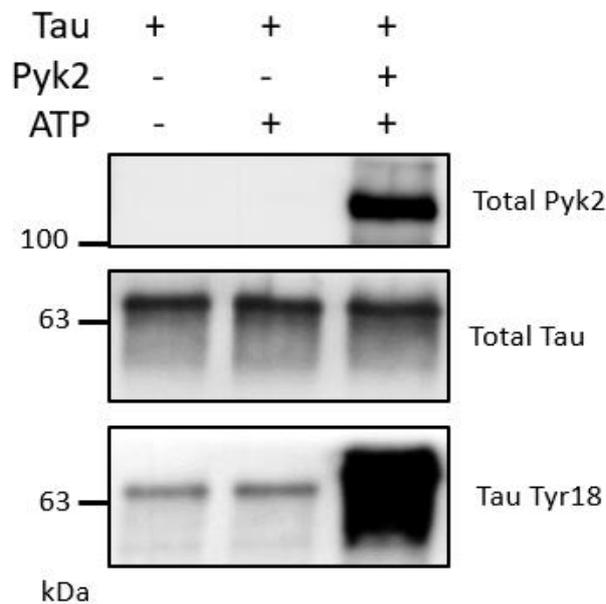
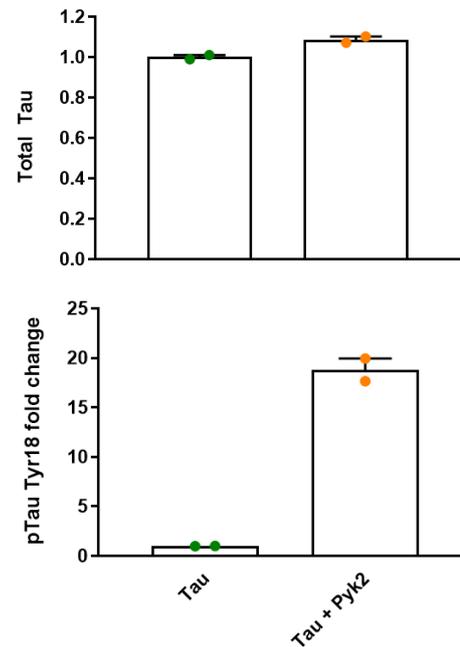
### A. Pyk2 interagit avec Tau et la phosphoryle sur sa tyrosine 18

Afin de comprendre les relations entre Pyk2 et Tau, nous avons tout d'abord étudié leur potentielle interaction. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) sur des neurones en culture d'embryons de souris (**Figure 8A**). Lorsque l'on immunoprécipite Pyk2 à partir d'un lysat cellulaire, on observe la co-immunoprécipitation de Tau. Cette expérience a été réalisée dans le sens inverse où lorsque l'on immunoprécipite Tau, on co-immunoprécipite la protéine Pyk2. Ces données suggèrent que les protéines Pyk2 et Tau interagissent, de manière directe ou indirecte. Pour confirmer cette interaction et identifier sa localisation, nous avons réalisé des expériences de complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC) qui consistent à transférer des neurones en culture avec un plasmide codant pour Pyk2 WT couplée à une demie GFP (appelée VN) et un plasmide codant pour Tau 1N4R couplée à la demie GFP complémentaire (appelée VC). Si les deux protéines interagissent, les deux demies GFP seront réunies et émettront une fluorescence verte (**Figure 8B**). Suite à la transfection des neurones avec la LA-RFP et les plasmides codant pour Pyk2 VC et Tau VN, on observe une fluorescence verte dans les neurones et donc une interaction des protéines Pyk2 et Tau (**Figure 8C**). Cette interaction est localisée dans tout le neurone, au niveau du corps cellulaire, des neurites et des épines dendritiques. Pour confirmer la spécificité de cette interaction et vérifier qu'elle n'est pas seulement due à l'interaction aléatoire des deux demies GFP, nous avons transfecté les neurones avec une autre construction plasmidique permettant l'expression de BACE1 VN ou BACE1 VC. Lorsque les neurones surexpriment Pyk2 VN et BACE1 VC, ou BACE1 VN et Tau VC, aucune fluorescence verte n'est observée. L'interaction observée entre Pyk2 et Tau dans les neurones semble donc spécifique.



**Figure 8 : Pyk2 interagit avec Tau dans les neurones. A)** Tau (à gauche) et Pyk2 (à droite) ont été immunoprécipitées à partir d'un lysat cellulaire de neurones en culture à l'aide d'anticorps anti-Tau et anti-Pyk2. Des Western Blots ont ensuite été réalisés afin d'identifier la co-immunoprécipitation de Pyk2 et Tau. L'input correspond à la quantité de protéine (en pourcentage) du lysat cellulaire, avant immunoprécipitation, déposée pour le Western Blot. Des billes vides (empty beads) ont été utilisées comme contrôle. **B)** Schéma de la technique de complémentation bimoléculaire par fluorescence : la protéine Pyk2 est couplée à une demie GFP appelée VN et la protéine Tau est couplée à la demie GFP complémentaire appelée VC. Lorsque ces deux protéines interagissent, les deux demies GFP se complètent pour émettre une fluorescence verte. **C)** Images confocales de neurones corticaux d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec la LA-RFP (en rouge) et les plasmides codant pour Pyk2 WT VN + Tau 1N4R VC ou Pyk2 WT VN + BACE1 VC ou alors BACE1 VN + Tau 1N4R VC (en vert). Barre d'échelle = 10  $\mu$ m. Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2  $\mu$ m).

Puisque Pyk2 est une tyrosine kinase qui semble interagir avec Tau dans les neurones, nous nous sommes demandés si Pyk2 était capable de la phosphoryler. Pour cela, nous avons tout d'abord purifié la protéine Pyk2 couplée à un tag histidine. La protéine Tau 1N4R purifiée nous a été généreusement fournie par l'équipe d'Isabelle Arnal de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. La pureté des protéines recombinantes a été validée par coloration à l'Instant Blue et par Western Blot en utilisant des anticorps anti-Pyk2 ou anti-Tau et un anticorps anti-Histidine (**Figure 9A**). Nous avons ensuite effectué un essai kinase afin de vérifier si Pyk2 est capable de phosphoryler Tau. Lorsque les protéines Pyk2 et Tau sont incubées en présence d'ATP, on observe une phosphorylation 18 fois plus importante de Tau sur sa tyrosine 18 par rapport au contrôle ( $1 \pm 0.016$  lorsque Tau est incubée seulement avec de l'ATP contre  $18.80 \pm 1.153$  lorsque Tau et l'ATP sont incubées avec Pyk2) (**Figure 9B et C**). Pyk2 est donc une kinase de Tau capable de la phosphoryler sur sa tyrosine 18 *in vitro*.

**A****B****C**

**Figure 9 : Pyk2 phosphoryle Tau sur sa tyrosine 18 *in vitro*.** **A)** Coloration à l'Instant Blue et Western Blot des protéines recombinantes purifiées Pyk2 et Tau couplées à un tag histidine. Les protéines Pyk2 et Tau sont indiquées aux poids moléculaires attendus. Une faible dégradation des protéines est observée. **B)** Western Blot d'un essai kinase où les protéines recombinantes Pyk2 et Tau ont été incubées en présence d'ATP. L'expression des protéines Pyk2 et Tau totale (respectivement total Pyk2 et total Tau) ainsi que la phosphorylation sur la tyrosine 18 de Tau (Tau Tyr18) sont représentées. **C)** Quantification des résultats obtenus en **(B)**. La condition Tau + Pyk2 (+ ATP – en orange) a été exprimée en fonction de la condition

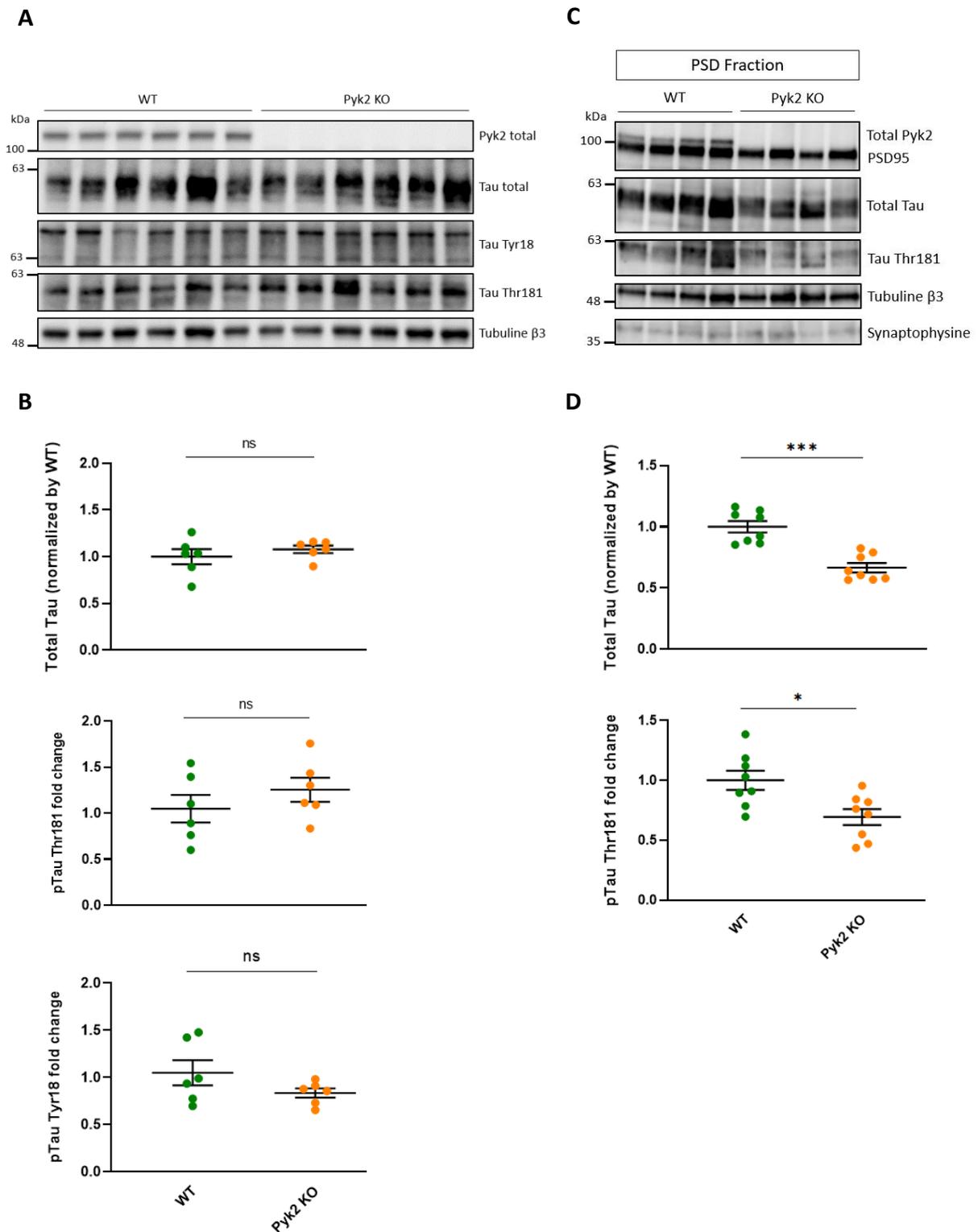
Tau seule (+ ATP – en vert). La phosphorylation de Tau a été évaluée par le ratio Tau Tyr18 / Tau totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (n = 2 par groupe).

Dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré que les A $\beta$  entraînent une translocation de la protéine Tau au niveau des épines dendritiques conduisant à des effets synaptotoxiques (Ittner et al. 2010). De notre côté, nous avons montré que ces oligomères d'A $\beta$  induisent une augmentation de l'activité de Pyk2 dans ces mêmes épines dendritiques des neurones de l'hippocampe. Ainsi, puisque Pyk2 interagit avec Tau dans les neurones et est capable de la phosphoryler sur sa tyrosine 18 *in vitro*, nous nous sommes interrogés sur le rôle de Pyk2 dans les effets synaptotoxiques médiés par Tau.

## B. Pyk2 induit la phosphorylation de Tau dans les épines dendritiques et participe à sa localisation synaptique

Afin d'étudier l'implication de Pyk2 dans la synaptotoxicité induite par la protéine Tau, nous avons tout d'abord exploré l'effet de l'absence de Pyk2 sur l'expression et la phosphorylation de la protéine Tau. Pour ce faire, nous avons réalisé des Western Blots sur des lysats d'hippocampes de souris WT et Pyk2 KO de 3 mois (**Figure 10A et B**). Nous avons étudié deux phosphorylations de Tau : la tyrosine 18 dont nous avons montré la phosphorylation par Pyk2 *in vitro*, et la thréonine 181, un biomarqueur utilisé dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Clifford R. Jack et al. 2018). Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, bien que Pyk2 soit une tyrosine kinase, elle est capable de phosphoryler et d'activer la GSK-3 $\beta$ , une thréonine/sérine kinase de Tau. C'est pourquoi, nous voulions explorer une phosphorylation potentielle directe ou indirecte de Tau par Pyk2. Dans les lysats totaux, nous n'avons observé aucune modification de l'expression ou de la phosphorylation de Tau chez les souris Pyk2 KO par rapport aux souris WT. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'absence de Pyk2 sur Tau spécifiquement au niveau synaptique. Nous avons donc réalisé des fractionnements cellulaires d'hippocampes de souris WT et Pyk2 KO de 3 mois (**Figure 10C et D**). Chez les souris Pyk2 KO, on observe une diminution significative de la protéine Tau dans la fraction PSD par rapport aux souris WT ( $1.00 \pm 0.05$  chez les souris WT contre  $0.67 \pm 0.04$  chez les souris Pyk2 KO ;  $p = 0.0002$ ). De même, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de Tau sur sa thréonine 181 chez les souris Pyk2 KO par rapport aux souris WT ( $1.00 \pm 0.08$  chez les souris WT vs  $0.69 \pm 0.07$  chez

les souris Pyk2 KO ;  $p = 0.0207$ ). Cependant, lors de l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la tyrosine 18 phosphorylée de Tau, nous n'avons détecté aucun signal. Ceci pourrait s'expliquer par une absence de Tau phosphorylée sur la tyrosine 18 dans les épines dendritiques.

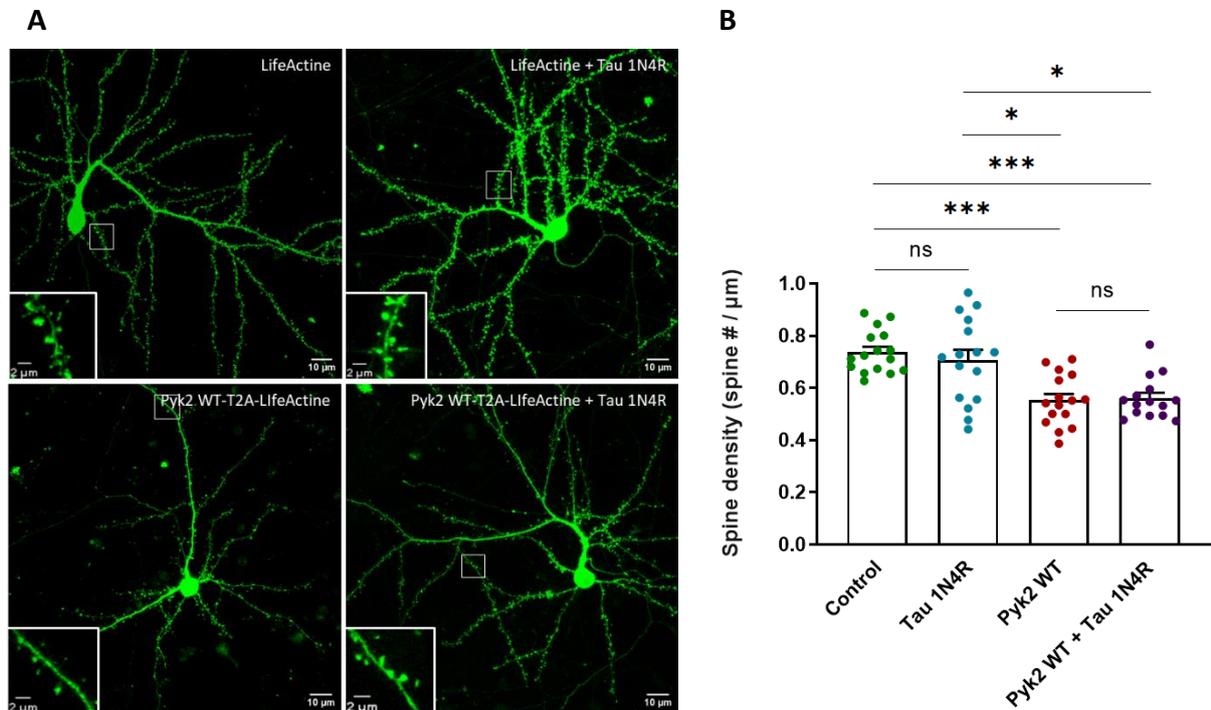


**Figure 10 : Pyk2 favorise la localisation synaptique de Tau et induit sa phosphorylation dans les épines dendritiques. A)** Western Blot d'un lysat total d'hippocampes de souris WT et Pyk2

KO de 3 mois. L'expression de Tau totale (total Tau) et phosphorylée sur la thréonine 181 (Tau Thr181) et la tyrosine 18 (Tau Tyr18) est représentée. La tubuline  $\beta$ 3 est utilisée comme contrôle de chargement des protéines. **B)** Quantification des résultats obtenus en **(A)**. Les données ont été normalisées par la tubuline puis la condition Pyk2 KO a été exprimée en fonction de la condition WT. La phosphorylation de Tau a été évaluée par le ratio pTau Thr181 / Tau totale et pTau Tyr18 / Tau totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 souris par groupe). Tests de Mann-Whitney, ns = non significatif. **C)** Western Blot d'un fractionnement cellulaire d'hippocampes de souris WT et Pyk2 KO de 3 mois. L'expression de Tau totale (total Tau) et phosphorylée sur la thréonine 181 (Tau Thr181) est représentée. La tubuline  $\beta$ 3 est utilisée comme contrôle de chargement des protéines. La PSD95 est utilisée pour confirmer l'enrichissement des protéines de caractérisation dans la fraction post-synaptique et la synaptophysine est utilisée pour caractériser l'absence des protéines de la fraction pré-synaptique ce qui signe la qualité du fractionnement. **D)** Quantification des résultats obtenus en **(C)**. Les données ont été normalisées par la tubuline puis la condition Pyk2 KO a été exprimée en fonction de la condition WT. La phosphorylation de Tau a été évaluée par le ratio pTau Thr181 / Tau totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 souris par groupe). Tests de Mann-Whitney, \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001.

Ces résultats mettent en avant un rôle de Pyk2 dans la localisation synaptique de Tau et sa phosphorylation dans les épines dendritiques des neurones de l'hippocampe. Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, la phosphorylation de Tau favorise son agrégation ce qui pourrait conduire à une synaptotoxicité. Nous nous sommes donc demandés si la surexpression concomitante de Pyk2 et Tau dans des neurones en culture conduirait à une aggravation du phénotype synaptique observé lorsque l'on surexprime Pyk2 seul. Pour cela, nous avons transfectés des neurones corticaux en culture avec des plasmides codant pour la protéine Tau 1N4R humaine et Pyk2 WT (**Figure 11**). Lorsque les neurones surexpriment uniquement Tau, aucune différence n'est observée par rapport aux neurones contrôles. La surexpression de Tau humaine ne semble donc pas impacter la densité des épines dendritiques. Lorsque les neurones sont transfectés avec Pyk2, on retrouve la diminution de la densité des épines dendritiques par rapport aux contrôles précédemment observée ( $0.74 \pm 0.02$  épines/ $\mu$ m pour les contrôles contre  $0.55 \pm 0.02$  épines/ $\mu$ m pour les neurones surexprimant Pyk2 WT ; p = 0.0004). Cette densité des épines des neurones transfectés avec Pyk2 WT est également significativement plus faible que celle des neurones surexprimant la protéine Tau ( $0.71 \pm 0.04$  épines/ $\mu$ m ; p = 0.0130). Lorsque l'on surexprime à la fois Pyk2 et Tau, on observe une diminution significative de la densité des épines par rapport aux neurones contrôles ( $0.74 \pm 0.02$  épines/ $\mu$ m pour les contrôles vs  $0.56 \pm 0.02$  épines/ $\mu$ m pour les

neurones transfectés avec Pyk2 et Tau ;  $p = 0.0009$ ) et aux neurones surexprimant seulement la protéine Tau ( $p = 0.0215$ ). Cependant, aucune différence n'est observée entre les neurones surexprimant Pyk2 et ceux transfectés à la fois avec Pyk2 et Tau. La surexpression de Pyk2 ne semble donc pas induire d'effets synaptotoxiques de la protéine Tau dans notre modèle.



**Figure 11 : La surexpression de Pyk2 n'induit pas de synaptotoxicité de Tau.** **A)** Images confocales représentatives de neurones corticaux d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec la LA-GFP et mCherry-Tau 1N4R ou avec GFP-Pyk2 WT-T2A-LA-GFP avec ou sans le plasmide codant pour mCherry-Tau 1N4R. Seules les images avec la LA-GFP ou GFP-Pyk2 WT-T2A-LA-GFP surexprimée sont représentées. Barre d'échelle = 10 μm. Le carré blanc représente un agrandissement de l'image (barre d'échelle = 2 μm). **B)** Quantification de la densité des épines dendritiques des neurones transfectés dans les mêmes conditions qu'en **(A)**. La condition « control » correspond aux neurones transfectés seulement avec la LA-GFP. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne ± SEM (Control,  $n = 16$  ; Tau 1N4R,  $n = 16$  ; Pyk2 WT,  $n = 16$  ; Pyk2 + Tau 1N4R,  $n = 15$  neurones de 4 cultures différentes). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns = non significatif.

L'ensemble de ces résultats semble aller dans le sens d'une relation étroite entre les protéines Pyk2 et Tau. En effet, au-delà de l'interaction existante entre ces deux protéines, Pyk2 est capable de moduler la phosphorylation de Tau. Elle entraîne une phosphorylation directe de Tau sur sa tyrosine 18 *in vitro* et semble également induire sa phosphorylation de manière indirecte sur sa thréonine 181. Enfin, les expériences sur les souris Pyk2 KO mettent

en lumière un rôle prépondérant de Pyk2 dans la localisation synaptique de Tau qui pourrait participer à la synaptotoxicité médiée par les protéines A $\beta$  et Tau dans la maladie d'Alzheimer.

## Discussion

---

Le développement de la maladie d'Alzheimer est influencé par divers facteurs de risques dont la majeure partie sont génétiques. Le gène *PTK2B* codant pour la protéine Pyk2 a été identifié comme l'un d'entre eux (European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013). Depuis, différents travaux ont mis en évidence l'implication de cette tyrosine kinase dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, particulièrement au niveau de la fonction synaptique, dont l'altération est un évènement précoce de la maladie (S. W. Scheff et al. 2007). Cependant, ces découvertes sont marquées par une dualité des résultats, opposant un rôle protecteur et délétère de Pyk2 dans la maladie. L'objectif de ce travail de thèse était d'identifier, dans notre modèle, l'impact de Pyk2 sur les mécanismes physiopathologiques précoces de la maladie d'Alzheimer.

Au cours de cette étude, nous avons montré l'implication de Pyk2 dans l'hyperactivité neuronale hippocampique induite par les oligomères d'A $\beta$  (A $\beta$ o), caractéristique des phases précoces de la maladie. Pyk2 pourrait participer à cette perturbation de la neurotransmission via son activation et/ou son activité kinase. Nous avons également mis en évidence l'implication des propriétés de protéine d'échafaudage de Pyk2 dans la diminution de la densité synaptique des neurones corticaux dans un contexte de surexpression de cette kinase. Enfin, nos résultats démontrent une association entre les protéines Pyk2 et Tau. Au cours de cette interaction, Pyk2 serait capable de phosphoryler Tau, directement ou indirectement, et de favoriser sa localisation synaptique dans les neurones de l'hippocampe.

### I. Rôle de Pyk2 dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer

Ce travail de thèse a tout d'abord révélé un rôle de Pyk2 dans les perturbations de la neurotransmission induite par les A $\beta$ o. Le stade prodromal de la maladie d'Alzheimer se caractérise par une hyperactivité de l'hippocampe (Dickerson et al. 2005). Cette altération précoce de la neurotransmission, caractéristique de la maladie d'Alzheimer chez l'Homme, est retrouvée dans le modèle de souris APP/PS1-21 utilisé au laboratoire à un mois et peut être reproduite par un traitement de l'hippocampe de souris WT d'un mois avec des formes oligomériques d'A $\beta$  (Bosson et al. 2017; Paumier et al. 2022). Nous avons montré que la délétion génétique de Pyk2 prévient la survenue de cette hyperactivité hippocampique

induite par des A $\beta$ . De plus, ce phénomène d'hyperactivité chez des souris APP/PS1-21 d'un mois et dans l'hippocampe de souris WT d'un mois traité avec des A $\beta$  est accompagné d'une activation de Pyk2 qui suggère l'implication de son activité kinase. En effet, dans la maladie d'Alzheimer, cette hyperactivité de l'hippocampe peut résulter de l'accumulation anormale de glutamate dans la fente synaptique conduisant à une sur-activation des récepteurs NMDA et une augmentation de calcium intracellulaire (Zott et al. 2019; Fani et al. 2021). Cette augmentation de calcium intracellulaire induite par les A $\beta$  pourrait ainsi activer Pyk2 qui en retour phosphorylerait les récepteurs NMDA renforçant ainsi leur activité. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Kaufman et al., 2015 qui ont montré une augmentation de la phosphorylation des protéines Fyn, Pyk2 et de la sous unité NR2B des récepteurs NMDA lors d'un traitement de tranches de cerveau de souris WT d'un mois avec des A $\beta$ . Cependant, l'activité kinase de Pyk2 dépend d'une activation complète de la protéine. Pour cela, la phosphorylation de ses tyrosines 579 et 580 est nécessaire (X. Li et al. 1999). Il serait donc pertinent d'étudier l'état de phosphorylation de ces résidus ainsi que celui des récepteurs NMDA chez les souris WT et Pyk2 KO traitées avec des A $\beta$ . En plus des récepteurs NMDA, Pyk2 pourrait favoriser l'hyperactivité des neurones de l'hippocampe via son action sur les canaux potassiques Kv1.2 (Felsch, Cachero, et Peralta 1998; Nesti, Everill, et Morielli 2004). La phosphorylation de ce canal par Pyk2 induit son endocytose ce qui pourrait également participer à et favoriser l'hyperactivité.

Il est à noter que le modèle Pyk2 KO pourrait présenter des perturbations de la neurotransmission, masquant ainsi les effets des A $\beta$ . Alors qu'une étude n'a montré aucun impact sur la neurotransmission excitatrice via un protocole de LTP TBS (Salazar et al. 2019) chez les souris Pyk2 KO, un autre groupe de recherche a mis en évidence une perturbation de la LTP via un protocole HFS (Giralt et al. 2017). Au sein du laboratoire, l'utilisation de ces deux protocoles sur des tranches d'hippocampes de souris Pyk2 KO n'a révélé aucune perturbation de la LTP, et même une légère augmentation de la potentialisation lors du protocole HFS (**Figure Annexe 3**). Ces divergences pourraient s'expliquer par l'utilisation de paramètres différents pour induire les LTP HFS et TBS. Ainsi, l'absence de perturbation de la neurotransmission excitatrice chez nos souris Pyk2 KO soutient notre interprétation des résultats de patch-clamp. Afin de s'affranchir des éventuelles perturbations neurodéveloppementales des souris Pyk2 KO, il serait néanmoins nécessaire de confirmer ces résultats en inhibant l'expression de Pyk2 par l'utilisation d'un siRNA chez les souris WT avant de les traiter avec des A $\beta$ , mais également chez les souris APP/PS1-21.

Dans la maladie d'Alzheimer, tout comme dans notre modèle de souris APP/PS1-21, l'hyperactivité neuronale de l'hippocampe laisse ensuite place à une hypoactivité (Celone et al. 2006; Paumier et al. 2022). Chez les souris APP/PS1-21, ce basculement entre hyper- et hypoactivité s'opère entre 1 et 3 mois. Au cours de cette transition, nous avons observé une modification de l'état de phosphorylation de Pyk2 chez les souris APP/PS1-21, avec un retour à un niveau comparable aux souris WT à 3 mois, lorsque qu'elles présentent une hypoactivité des neurones de l'hippocampe.

L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle de Pyk2 dans les phases précoces de la pathologie. Contrairement aux données de la littérature, cette étude a été réalisée à un stade de développement où aucune altération structurale ou cognitive, ni aucun dépôt amyloïde caractéristique de la maladie n'a encore été détecté. En effet, à ma connaissance, toutes les expériences réalisées sur des modèles de souris Alzheimer ont évalué l'impact de Pyk2 à des stades plus tardifs, lorsque les déficits synaptiques et cognitifs sont déjà installés (Giralt et al. 2018; Salazar et al. 2019). Ainsi, bien que les mécanismes exacts par lesquels Pyk2 influe sur le développement de la maladie d'Alzheimer ne sont pas encore totalement compris, il semblerait qu'elle puisse intervenir à différents stades de la pathologie où elle pourrait être associée à différents mécanismes selon l'âge des souris ou le modèle utilisé.

## **II. Impact de Pyk2 sur la densité synaptique**

Dans la maladie d'Alzheimer, la perte de synapses est un évènement précoce qui conduira *in fine* à l'apparition de troubles cognitifs. Dans notre modèle de culture primaire de neurones corticaux, nous avons montré que la surexpression de Pyk2 entraîne une diminution de la densité synaptique indépendamment de son activation et de son activité kinase mais semble plutôt impliquer son domaine PR1. Cette diminution de la densité synaptique en réponse à la surexpression de Pyk2 a également été observée dans des neurones d'hippocampes en culture (S. Lee et al. 2019). Cependant, dans ce cas, cet effet était dépendant de ses domaines kinase et PR2 et ferait intervenir les protéines Graf1c et RhoA. Néanmoins, il semblerait que les domaines riches en proline de Pyk2 jouent un rôle essentiel dans cet effet synaptique. En effet, outre ses fonctions de protéine kinase, Pyk2 présente des propriétés de protéine d'échafaudage. Dans leur étude, Giralt et al., 2017 ont montré que la surexpression de Pyk2 dans des neurones hippocampiques en culture de souris Pyk2 KO reverse la diminution de densité synaptique qu'ils ont observé chez ces souris de manière

indépendante de sa phosphorylation et de son activité kinase. En revanche, le regroupement de PSD95 à l'épine, indispensable à sa structure, nécessitait la phosphorylation et l'activité kinase de Pyk2. De même, l'utilisation de souris Pyk2 KO et de souris Pyk2 avec la mutation Y402F, empêchant ainsi sa trans-autophosphorylation, a mis en évidence l'implication de Pyk2 dans la suppression de la peur contextuelle de manière indépendante de son activation (Zheng et al. 2022). Bien que nos résultats démontrent un rôle de Pyk2 indépendamment de son activation, un rôle du calcium dans ce processus n'est pas à exclure. Pyk2 est nativement repliée en conformation fermée du fait d'une interaction intramoléculaire du domaine FERM avec le domaine kinase (Loving et Underbakke 2019). La fixation du complexe calcium/calmoduline sur différents sites de Pyk2 permet la libération de cette interaction ce qui pourrait libérer des sites de fixation, notamment le domaine PR1, pour des partenaires de Pyk2. L'interaction de Pyk2 avec ses partenaires pourrait conduire à une perturbation de la dynamique de l'actine, comme l'indiquent nos résultats de FRAP. Cependant, le faible impact de la surexpression de Pyk2 sur cette dynamique suggère l'existence d'autres mécanismes participant à la diminution de la densité synaptique.

Ainsi, bien que les mécanismes responsables de cette modulation de la densité synaptique observée dans différents laboratoires et dans notre étude ne soient pas encore totalement élucidés, ces données démontrent une double fonction de Pyk2 au niveau synaptique, l'une dépendante de ses propriétés kinases et l'autre de ses propriétés de protéine d'échafaudage et/ou de ses interactions avec des partenaires protéiques. Il est également important de considérer que la mutation du domaine PR1 dans notre étude pourrait avoir un impact sur ces deux propriétés de Pyk2. En effet, son activation complète repose sur le recrutement des SFKs et notamment de Src, via la fixation de leur domaine SH2 à la tyrosine 402 phosphorylée de Pyk2 mais également par l'interaction de leur domaine SH3 avec le domaine PR1 de Pyk2 (Thomas et al. 1998). Ainsi, cette mutation du domaine PR1 pourrait empêcher la fixation d'autres partenaires sur ce domaine, mais également la fixation des SFKs, inhibant ainsi les deux mécanismes de Pyk2 susceptibles de conduire à la diminution de la densité synaptique : l'activité kinase et les propriétés de protéine d'échafaudage.

Dans nos cultures de neurones corticaux, la surexpression de l'APP humaine portant la mutation Swedish (APP<sup>sw</sup>) conduit à une surproduction d'A $\beta$  dans les neurones et la diminution subséquente de la densité synaptique. Malgré l'impact d'une surexpression de Pyk2 sur la densité synaptique, nous n'avons observé aucune aggravation du phénotype synaptique de l'APP<sup>sw</sup> par la co-transfection de Pyk2 WT et l'APP<sup>sw</sup>. De plus, la surexpression

simultanée de l'APPsw et du mutant proline de Pyk2 n'a pas réversé la perte synaptique engendrée par la surexpression de l'APPsw. Ces résultats soulèvent donc plusieurs questions. Tout d'abord, l'absence d'impact du mutant proline de Pyk2 sur l'effet de la surexpression de l'APPsw suggère que ces deux protéines pourraient agir sur la densité synaptique via des voies distinctes. Cependant, l'absence d'effet cumulatif de l'APPsw et Pyk2 WT nous laisse penser que ces deux protéines pourraient agir sur cette densité via des voies distinctes mais sur des cibles communes. Cette absence d'effet du mutant proline de Pyk2 pourrait également résulter de la présence de Pyk2 endogène dans les neurones, qui serait suffisante pour médier les effets de l'APPsw. Pour répondre à ces questions, il serait nécessaire de reproduire ces expériences de transfections de l'APPsw chez des souris Pyk2 KO.

### III. Influence de Pyk2 sur la protéine Tau

Nous avons montré une interaction entre les protéines Pyk2 et Tau dans les neurones. Ces résultats corroborent les observations précédentes d'une interaction de ces protéines *in vitro* et *in vivo* (C. Li et Götz 2018). Alors que notre étude, tout comme celle de ce groupe de recherche, démontre que Pyk2 est capable de phosphoryler directement Tau sur sa tyrosine 18 *in vitro*, d'autres travaux ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de Tau sur différents sites, notamment des sérine 202 et thréonine 205 (anticorps AT8) et des sérines 396 et 404 (anticorps PHF-1) lors de l'inhibition de Pyk2, via une délétion génétique ou un inhibiteur de Pyk2, dans un modèle de souris tauopathique (Brody et al. 2022). Ces différences pourraient résulter d'un rôle différent de Pyk2 selon les sites de phosphorylation de Tau, où Pyk2 induirait la phosphorylation de certains sites plutôt que d'autres. Dans les neurones, la phosphorylation de la tyrosine 18 de Tau favorise le transport antérograde de cargos via la kinésine (Stern et al. 2017). Ainsi, une phosphorylation exacerbée de ce résidu par Pyk2 dans le cadre de la maladie d'Alzheimer pourrait entraîner une augmentation du transport antérograde de Tau participant à sa relocalisation dendritique observée dans la maladie (Pickett et al. 2019).

Le rôle de Pyk2 dans la phosphorylation de Tau pourrait également impliquer la protéine Fyn. En effet, Fyn est également une kinase de Tau (C. Li et Götz 2017) capable d'interagir et d'activer Pyk2 (Corvol et al. 2005; C. Li et Götz 2018). Pyk2 pourrait ensuite phosphoryler Tau, renforçant ainsi son interaction avec Fyn (Bhaskar, Yen, et Lee 2005) ce qui conduirait à une phosphorylation de Tau exacerbée. De plus, il n'est pas exclu que Tau

participe au transport de Pyk2 dans les épines dendritiques. Des études ont montré que Tau permet la translocation de Fyn au niveau des épines (Ittner et al. 2010). L'interaction de ces protéines avec Pyk2 pourrait donc favoriser le transport de Pyk2 vers le compartiment post-synaptique. Il semblerait donc exister un complexe protéique incluant les protéines Fyn, Pyk2 et Tau qui, sous l'influence des A $\beta$ , pourrait induire la phosphorylation et l'oligomérisation de Tau conduisant aux processus neurotoxiques.

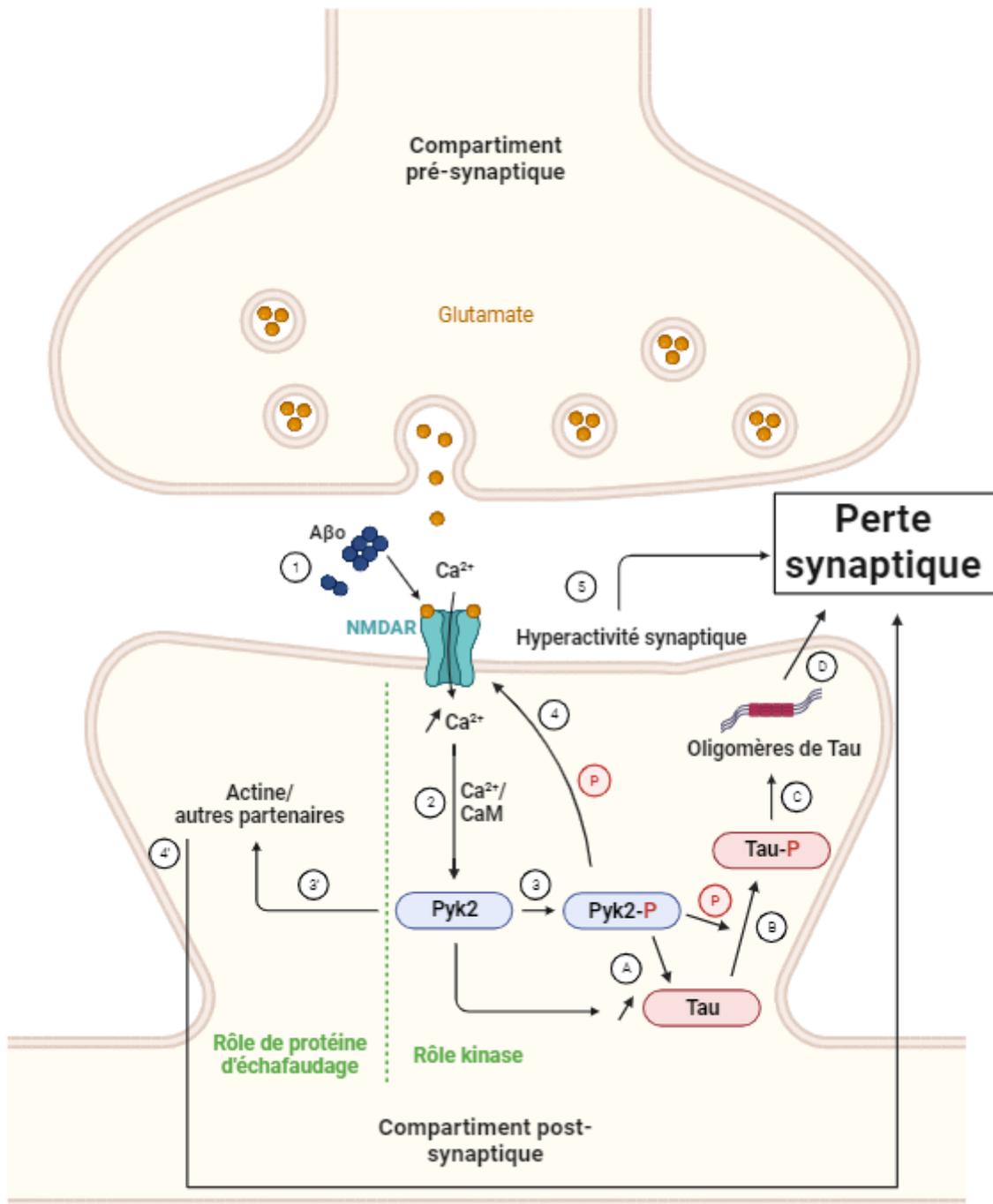
En plus de son rôle de kinase de Tau, nos résultats sur les souris Pyk2 KO mettent en avant l'implication de Pyk2 dans la localisation synaptique de Tau, ce qui pourrait participer aux effets synaptotoxiques de cette protéine. Nous avons également montré une diminution de la phosphorylation de Tau sur sa thréonine 181 dans le compartiment post-synaptique des souris Pyk2 KO, suggérant que Pyk2 pourrait induire cette phosphorylation de Tau. Celle-ci se ferait de manière indirecte, potentiellement via l'activation de la GSK-3 $\beta$  par Pyk2 (Sayas et al. 2006), et pourrait conduire à son agrégation et à des troubles de la neurotransmission en condition pathologique (Hoover et al. 2010). Les mécanismes par lesquels Pyk2 favorise la localisation synaptique de Tau ne sont pas encore connus mais il serait possible que, sous A $\beta$ , l'activation de Pyk2 conduise à la phosphorylation de Tau ce qui pourrait induire son détachement des microtubules permettant ainsi sa relocalisation synaptique. Pyk2 pourrait également séquestrer Tau au niveau synaptique via des interactions protéine-protéine avec des partenaires. Une fois encore, les propriétés kinasique et de protéine d'échafaudage de Pyk2 pourraient participer à la synaptotoxicité de Tau induite par les A $\beta$ . Tout comme l'activation de Pyk2 par les A $\beta$  semble localisée au niveau post-synaptique, la phosphorylation de Tau par Pyk2 semble également se produire dans ce compartiment. En effet, nos expériences sur des lysats totaux d'hippocampes de souris Pyk2 KO n'ont montré aucun impact de la délétion génétique de Pyk2 sur la phosphorylation de Tau. Cette absence d'effet pourrait résulter d'effets compensatoires chez les souris Pyk2 KO ou pourrait être expliquée par la faible incidence d'une absence de Pyk2 du fait de la présence de nombreuses kinases de Tau dans les neurones. On peut également envisager que la phosphorylation de Tau par Pyk2 ne s'effectue que localement, dans certains compartiments de la cellule, notamment en condition pathologique, ne permettant pas la détection de l'effet d'une délétion génétique de Pyk2.

Nos expériences de transfection neuronale avec la protéine Tau humaine n'ont mis en évidence aucune synaptotoxicité de la surexpression de Tau. Du fait de l'implication de Pyk2 dans phosphorylation de Tau et des effets synaptotoxiques d'une phosphorylation aberrante

de cette protéine, nous voulions tester si la co-transfection de ces deux protéines pourrait induire une toxicité de Tau via Pyk2. Nos résultats n'ont montré aucun effet de cette surexpression simultanée indiquant que, dans notre modèle, Pyk2 n'induit pas de toxicité synaptique de Tau. Plusieurs hypothèses découlent de ces observations. Tout d'abord, il se pourrait que les effets synaptotoxiques de Tau nécessitent la présence d'A $\beta$  oligomérique. En effet, selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, bien qu'il soit aujourd'hui admis que les pathologies Tau et A $\beta$  travaillent de concert, via des mécanismes différents, pour induire des déficits synaptiques et cognitifs, l'initiation de cette cascade reste le peptide  $\beta$ -amyloïde (D. J. Selkoe 1991). De plus, Haas & Strittmatter, 2016 ont mis en évidence que le traitement de tranches de cerveaux de souris APPSwe/PSEN1 $\Delta$ E9 avec un agoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate, le DHPG (3,5-dihydroxyphenylglycine), ne conduit plus à l'activation de Pyk2 comme c'est le cas chez les souris WT. Ces données suggèrent un mécanisme d'activation de Pyk2 différent en condition pathologique qui pourrait conduire à une phosphorylation et une agrégation pathologique de Tau. Il serait donc intéressant de reproduire nos expériences de transfection en présence d'A $\beta$ . Une autre hypothèse de l'absence d'effet de cette co-transfection serait que l'effet de Pyk2 sur la protéine Tau n'engendre tout simplement pas de perte synaptique. Récemment, un article a mis en évidence chez des sujets atteints de démence que la présence anormale d'oligomères de Tau dans les synapses pourrait servir de signal d'élimination des synapses à destination des cellules gliales conduisant à la perte synaptique et aux déficits cognitifs. Ainsi, puisque Pyk2 semble favoriser la localisation synaptique de Tau et sa phosphorylation, on peut imaginer que Pyk2 pourrait participer à la mise en place de ces signaux d'élimination (Taddei et al. 2023).

Enfin, nos expériences de complémentarité bimoléculaire par fluorescence ont mis en évidence une interaction de Pyk2 et Tau dans tout le neurone, y compris au niveau synaptique. Cela pourrait résulter de la surexpression de ces protéines, augmentant ainsi leur disponibilité et donc leur interaction. Cependant, ces résultats suggèrent que l'impact de Pyk2 sur Tau pourrait s'étendre au-delà du compartiment post-synaptique. En effet, Pyk2 est également localisée au niveau nucléaire (Faure, Ramos, et Girault 2013). Dans la maladie d'Alzheimer, l'hyperphosphorylation de Tau diminue sa translocation dans le noyau ainsi que sa capacité à lier et protéger l'ADN (Y. Lu et al. 2013). De plus, dans le noyau, la phosphorylation exacerbée de Tau diminue la viabilité des cellules (Brunello, Yan, et Huttunen 2016). Ainsi, en condition pathologique, Pyk2 pourrait contribuer à ces phénomènes en induisant sa phosphorylation.

En résumé, nos résultats démontrent une implication de Pyk2 dans l'hyperactivité hippocampique caractéristique des stades précoces de la maladie (**Figure 1**). De même, nous avons mis en évidence un rôle clé de Pyk2 dans la localisation et la phosphorylation de Tau dans le compartiment post-synaptique. L'étude des effets de la toxicité de Tau médiée par les A $\beta$  en présence ou en absence de Pyk2 serait donc d'un grand intérêt afin de confirmer l'implication de cette protéine au centre des pathologies amyloïde et Tau.



**Figure 1 : Voies de signalisation hypothétiques de l'implication de Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer. 1) L'activation des récepteurs NMDA par les oligomères d'A $\beta$  (A $\beta$ o) conduit à**

une augmentation de calcium intracellulaire. **2)** Le calcium forme ensuite un complexe avec la calmoduline (CaM) qui se fixe sur Pyk2 afin de modifier sa conformation. **3 à 5)** Pyk2, en conformation ouverte, se trans-autophosphoryle permettant ainsi son activation. Elle phosphoryle ensuite les récepteurs NMDA, renforçant ainsi leur activité. Cela favorise l'hyperactivité neuronale hippocampique qui entrainera *in fine* la perte de synapses. **3' et 4')** En parallèle, Pyk2 interagit avec des partenaires via son domaine PR1 conduisant également à une perte synaptique. **A à D)** Pyk2 et/ou Pyk2 phosphorylée entraîne une augmentation de la localisation synaptique de Tau. Pyk2 activée phosphoryle Tau conduisant à son agrégation. Cette agrégation toxique entrainera, elle aussi, une perte de synapses.

## IV. Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur le rôle de Pyk2 dans la synaptotoxicité associée à la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie neurodégénérative est la première cause de démence et représente une charge sociétale importante, tant au niveau économique que d'un point de vue humain. La pathogenèse de la maladie d'Alzheimer repose essentiellement sur les altérations de la neurotransmission synaptique engendrées par les oligomères d'A $\beta$  et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau conduisant aux déficits synaptiques et cognitifs caractéristiques de la maladie. Des études génomiques ont identifié la tyrosine kinase Pyk2 comme un facteur de risque associé au développement de la pathologie. Par la suite, plusieurs groupes de recherche ont confirmé son implication dans la maladie d'Alzheimer, bien que des résultats opposés aient été rapportés indiquant une dualité entre le rôle protecteur ou délétère de Pyk2 dans la maladie.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse montrent, pour la première fois, une implication de Pyk2 dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer. De plus, nous avons montré une implication de Pyk2 dans les aberrations pathologiques de Tau (phosphorylation et localisation synaptique) caractéristiques de la maladie. Bien que de nombreuses questions restent à élucider sur le rôle de Pyk2 dans les mécanismes physiopathologiques conduisant aux déficits cognitifs, nos travaux mettent en lumière Pyk2 comme une protéine à l'interface des pathologies amyloïde et Tau. Le développement de thérapies efficaces et spécifiques basées sur son inhibition s'avère donc crucial. Cette thèse met ainsi en valeur une fenêtre d'action thérapeutique précoce novatrice dans la maladie d'Alzheimer.

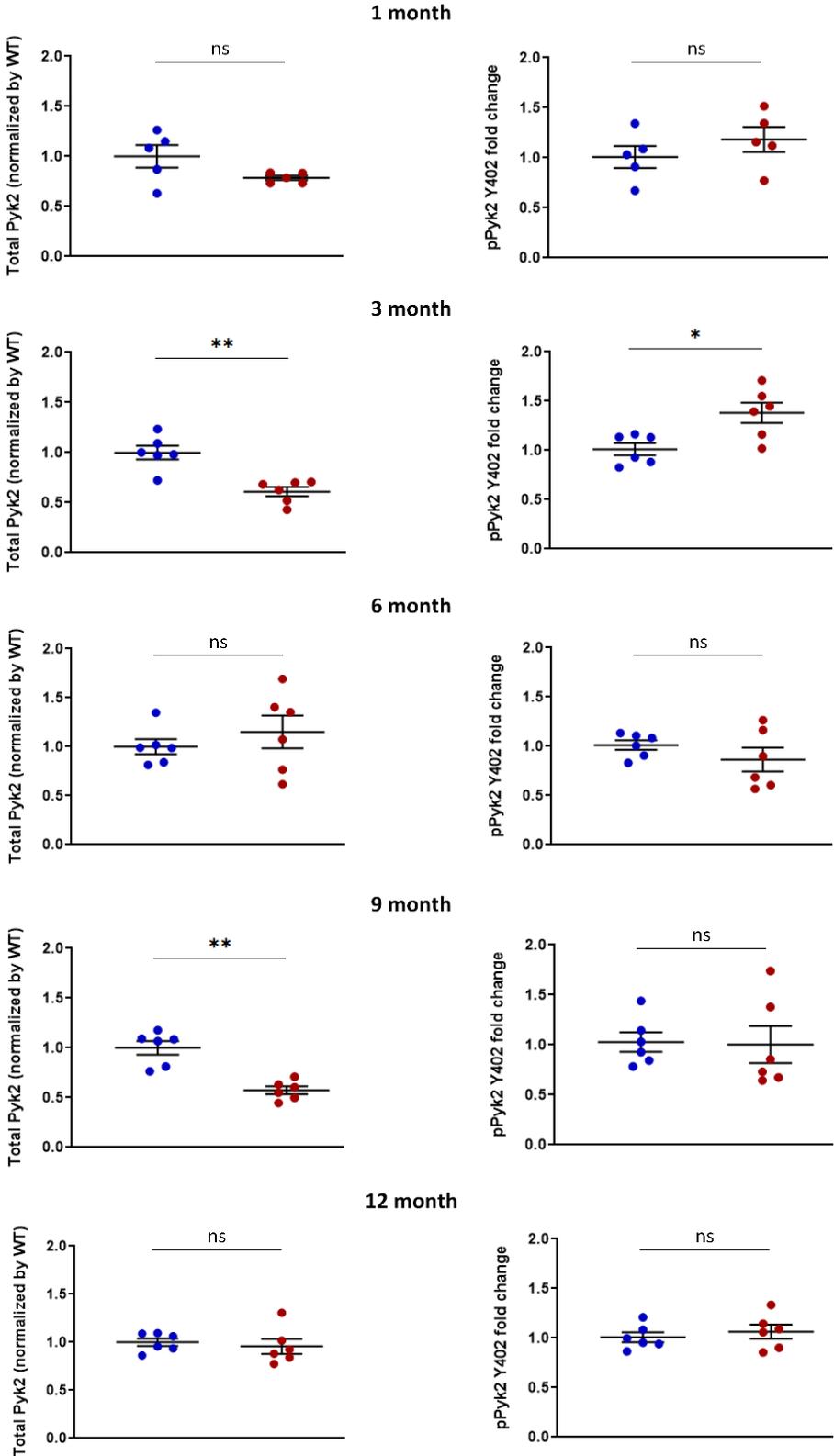


# Annexes

A

Cortex

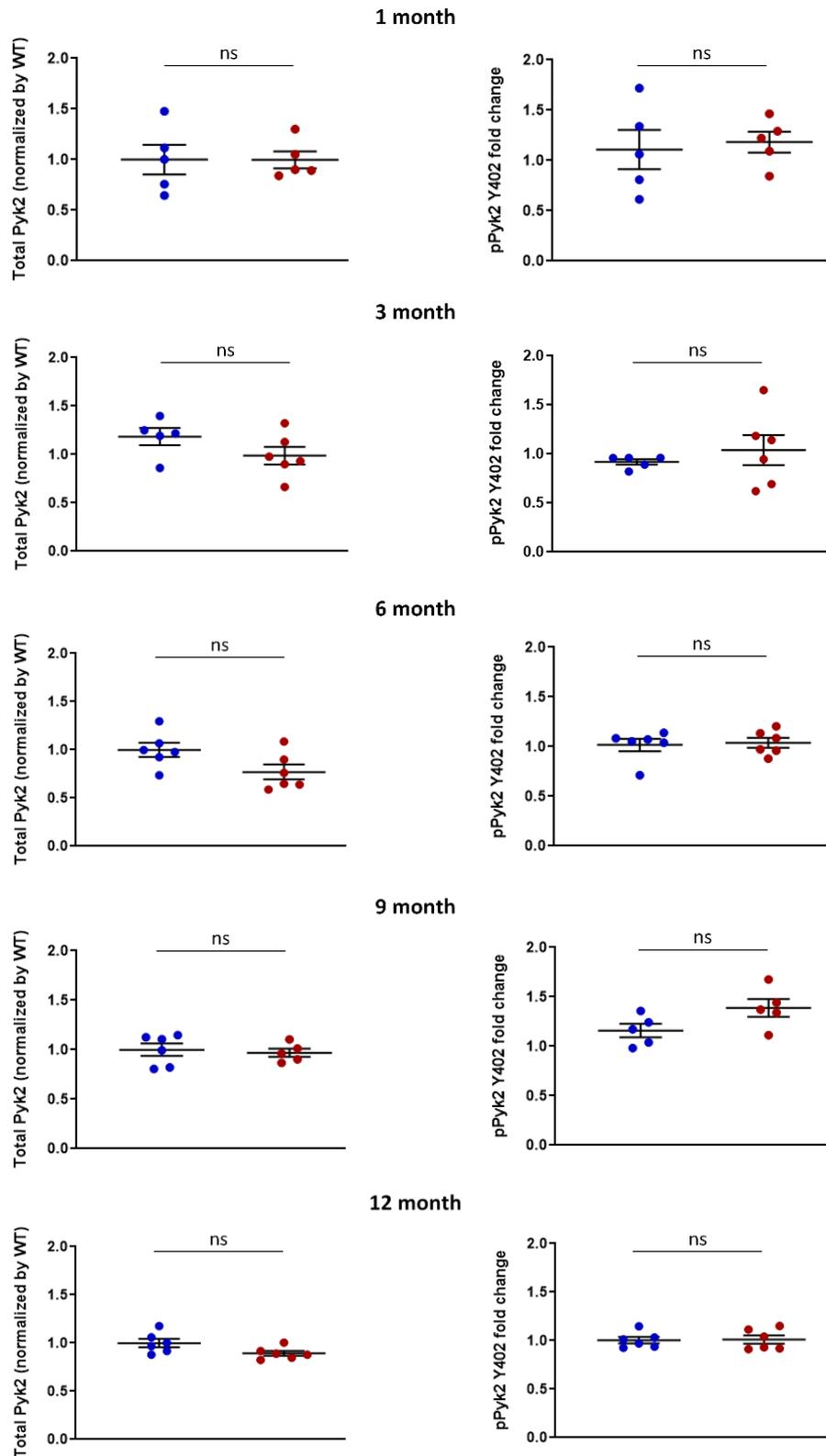
● WT  
● APP/PS1



**B**

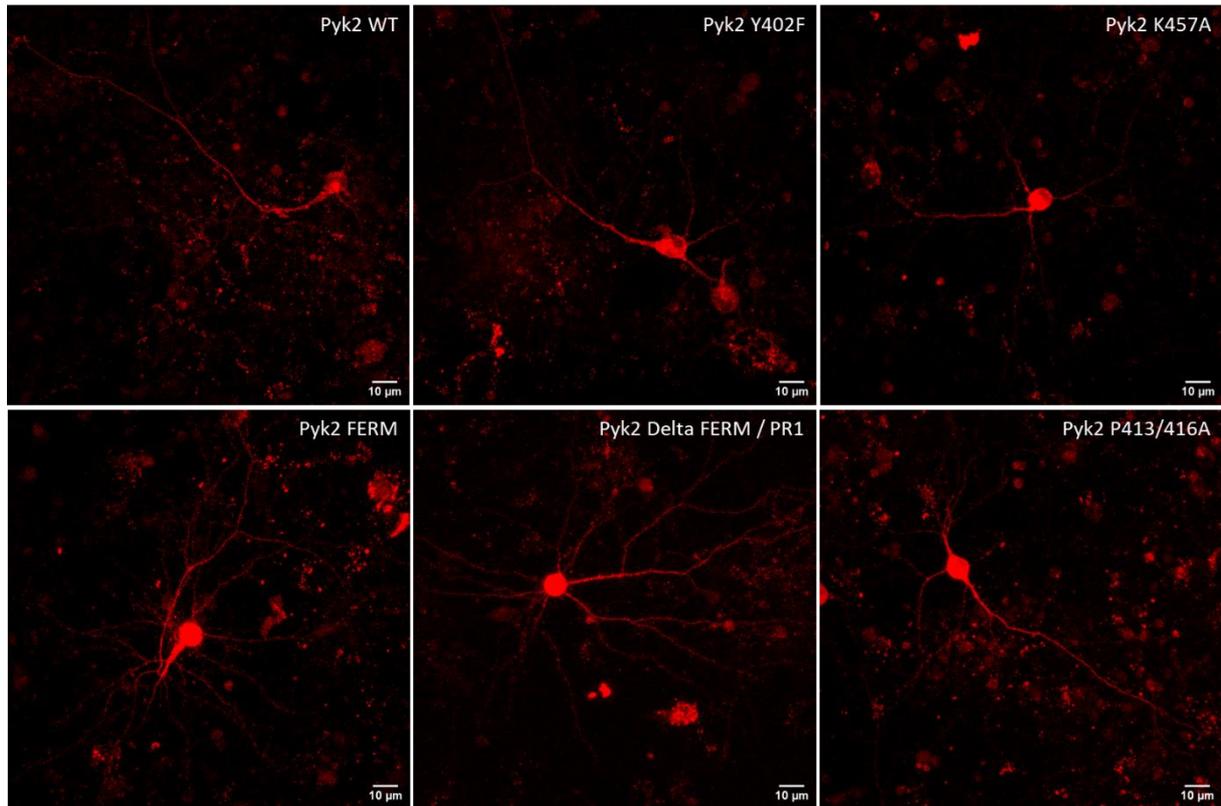
**Hippocampe**

● WT  
● APP/PS1

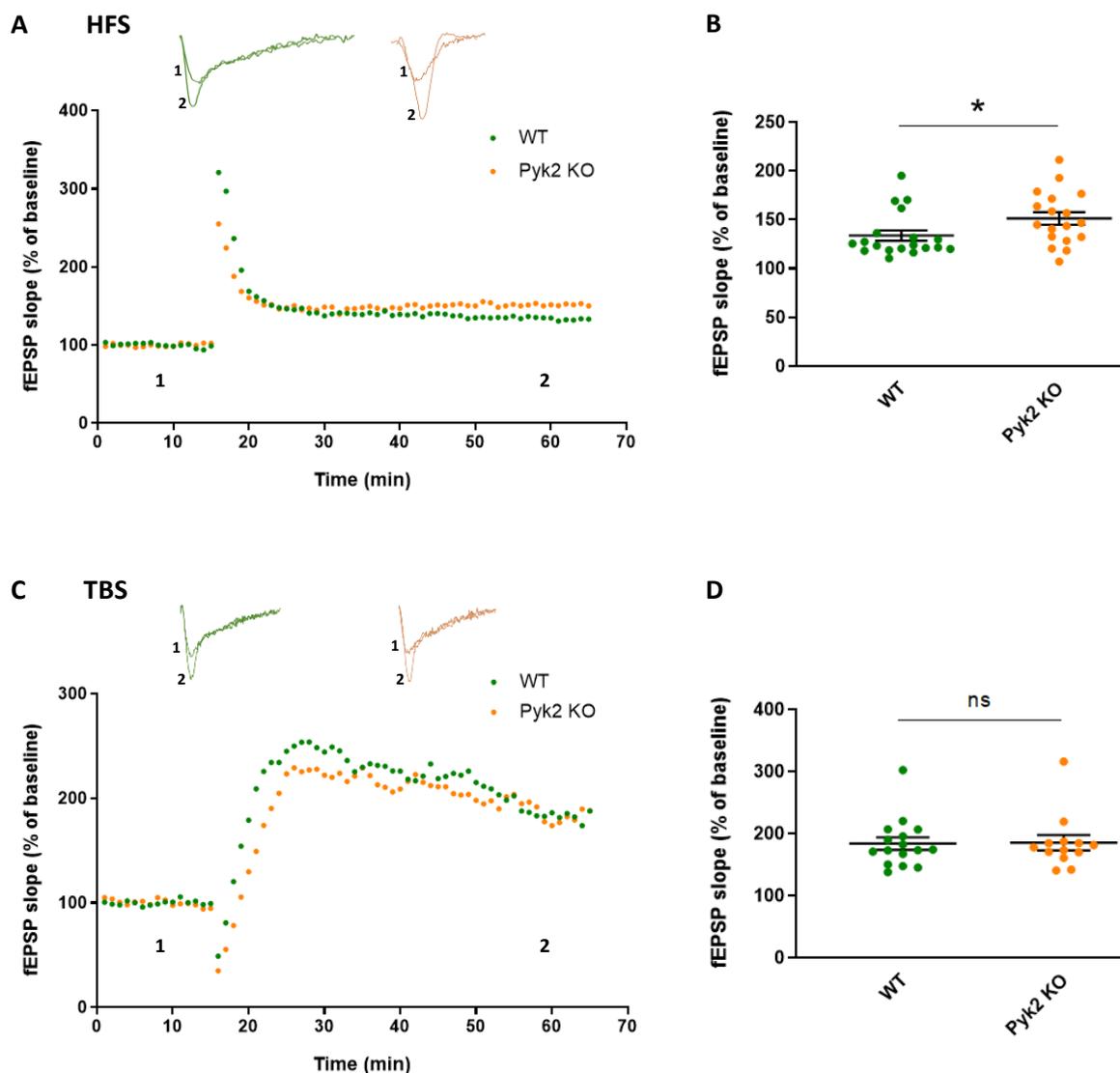


**Figure Annexe 1 : Expression et phosphorylation de Pyk2 dans le cortex et l'hippocampe de souris WT et APP/PS1-21 d'un mois, de 3, 6, 9 et 12 mois. A et B) Quantification de Western Blot de lysats de cortex (A) et d'hippocampes (B) de souris WT et APP/PS1-21 d'un mois, de 3,**

6, 9 et 12 mois. Les données ont été normalisées par la tubuline puis la condition APP/PS1-21 a été exprimée en fonction de la condition WT. La phosphorylation de Pyk2 a été évaluée par le ratio pPyk2 Y402 / Pyk2 totale. Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (n = 5 ou 6 souris par groupe). Tests de Mann-Whitney, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.



**Figure Annexe 2 : Expression des différentes formes, mutées ou tronquées, dePyk2.** Images confocales de neurones corticaux d'embryons de souris en culture. Les neurones ont été transfectés avec mCherry-Pyk2 WT, Y402F, K457A, FERM, Delta FERM / PR1 ou P414/416A (en rouge) à 13 DIV puis imagés 48h après transfection. Barre d'échelle = 10 μm.



**Figure Annexe 3 : La délétion génétique de Pyk2 n'induit pas d'altération de la neurotransmission excitatrice. A)** LTP HFS de souris WT et Pyk2 KO de 3 mois. Les courbes représentent la moyenne et sont exprimées en pourcentage de la pente des fEPSPs (potentiels postsynaptiques excitateurs de champ) obtenue lors de la baseline dans les tranches d'hippocampes des souris WT ou Pyk2 KO. Les traces représentatives d'une expérience sont présentées avant (1) et après (2) l'induction du protocole de stimulation HFS. Elles ont été extraites aux temps indiqués (1 et 2) sur le graphique. **B)** Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (WT, n = 19 tranches provenant de 13 souris ; Pyk2 KO, n = 18 tranches provenant de 12 souris). Elles sont exprimées en pourcentage de la pente des fEPSPs obtenue lors de la baseline et ont été mesurées lors des 10 dernières minutes de l'enregistrement. Test de Mann-Whitney, \*  $p < 0.05$ . **C)** LTP TBS de souris WT et Pyk2 KO de 3 mois. Les courbes représentent la moyenne et sont exprimées en pourcentage de la pente des fEPSPs obtenue lors de la baseline dans les tranches d'hippocampes des souris WT ou Pyk2 KO. Les traces représentatives d'une expérience sont présentées avant (1) et après (2) l'induction du protocole de stimulation TBS. Elles ont été extraites aux temps indiqués (1 et 2) sur le graphique. **D)** Les données sont représentées graphiquement par la moyenne  $\pm$  SEM (WT, n = 16 tranches provenant de 11 souris ; Pyk2 KO, n = 13 tranches provenant de 9 souris).

Elles sont exprimées en pourcentage de la pente des fEPSPs obtenue lors de la baseline et ont été mesurées lors des 10 dernières minutes de l'enregistrement. Test de Mann-Whitney, ns = non significatif.

## Références

---

- « 2023 Alzheimer's Disease Facts and Figures ». 2023. *Alzheimer's & Dementia* 19(4): 1598-1695.
- Abramov, Efrat et al. 2009. « Amyloid-Beta as a Positive Endogenous Regulator of Release Probability at Hippocampal Synapses ». *Nature Neuroscience* 12(12): 1567-76.
- Afonso, Pedro et al. 2019. « BDNF Increases Synaptic NMDA Receptor Abundance by Enhancing the Local Translation of Pyk2 in Cultured Hippocampal Neurons ». *Science Signaling* 12(586): eaav3577.
- Ahmed, Mahiuddin et al. 2010. « Structural Conversion of Neurotoxic Amyloid-B1-42 Oligomers to Fibrils ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17(5): 561-67.
- Ahmed, Tariq et al. 2014. « Cognition and Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice with a Homozygous Tau Deletion ». *Neurobiology of Aging* 35(11): 2474-78.
- Alawieyah Syed Mortadza, Sharifah, Joan A. Sim, Veronika E. Neubrand, et Lin-Hua Jiang. 2018. « A Critical Role of TRPM2 Channel in A $\beta$ 42 -Induced Microglial Activation and Generation of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  ». *Glia* 66(3): 562-75.
- Allingham, Michael J., Jaap D. van Buul, et Keith Burridge. 2007. « ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(6): 4053-64.
- Alonso, Alejandra Del C. et al. 2001. « Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of  $\tau$  into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(12): 6923-28.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein, et F. R. Murtagh. 1995. « An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Uber Eine Eigenartige Erkankung Der Hirnrinde" ». *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)* 8(6): 429-31.
- Amar, Fatou et al. 2017. « The Amyloid- $\beta$  Oligomer A $\beta$ \*56 Induces Specific Alterations in Neuronal Signaling That Lead to Tau Phosphorylation and Aggregation ». *Science Signaling* 10(478): eaal2021.
- Andreadis, Athena. 2006. « Misregulation of Tau Alternative Splicing in Neurodegeneration and Dementia ». *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 44: 89-107.

- Aragão Gomes, Luis et al. 2021. « Maturation of Neuronal AD-Tau Pathology Involves Site-Specific Phosphorylation of Cytoplasmic and Synaptic Tau Preceding Conformational Change and Fibril Formation ». *Acta Neuropathologica* 141(2): 173-92.
- Arbel-Ornath, Michal et al. 2017. « Soluble Oligomeric Amyloid- $\beta$  Induces Calcium Dyshomeostasis That Precedes Synapse Loss in the Living Mouse Brain ». *Molecular Neurodegeneration* 12(1): 27.
- Arcucci, Alessandro, Stefania Montagnani, et Elisa Gionti. 2006. « Expression and Intracellular Localization of Pyk2 in Normal and V-Src Transformed Chicken Epiphyseal Chondrocytes ». *Biochimie* 88(1): 77-84.
- Arendt, Thomas et al. 2003. « Reversible Paired Helical Filament-Like Phosphorylation of Tau Is an Adaptive Process Associated with Neuronal Plasticity in Hibernating Animals ». *The Journal of Neuroscience* 23(18): 6972-81.
- Aronov, S., G. Aranda, L. Behar, et I. Ginzburg. 2001. « Axonal Tau mRNA Localization Coincides with Tau Protein in Living Neuronal Cells and Depends on Axonal Targeting Signal ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21(17): 6577-87.
- Asai, Masashi et al. 2003. « Putative Function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP Alpha-Secretase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301(1): 231-35.
- Avraham, Shalom et al. 1995. « Identification and Characterization of a Novel Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase (RAFTK) from Megakaryocytes and Brain ». *Journal of Biological Chemistry* 270(46): 27742-51.
- Baglietto-Vargas, David et al. 2021. « Generation of a Humanized A $\beta$  Expressing Mouse Demonstrating Aspects of Alzheimer's Disease-like Pathology ». *Nature Communications* 12(1): 2421.
- Bakker, Arnold et al. 2012. « Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnesic Mild Cognitive Impairment ». *Neuron* 74(3): 467-74.
- Balusu, Sriram et al. 2023. « MEG3 Activates Necroptosis in Human Neuron Xenografts Modeling Alzheimer's Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 381(6663): 1176-82.
- Banno, Yoshiko et al. 2008. « Depolarization-Induced Differentiation of PC12 Cells Is Mediated by Phospholipase D2 through the Transcription Factor CREB Pathway ». *Journal of Neurochemistry* 104(5): 1372-86.
- Bartos, Jason A., Jason D. Ulrich, Hongbin Li, Michael A. Beazely, Yucui Chen, John F. Macdonald, et al. 2010. « Postsynaptic Clustering and Activation of Pyk2 by PSD-95 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(2): 449-63.

- Bartos, Jason A., Jason D. Ulrich, Hongbin Li, Michael A. Beazely, Yucui Chen, John F. MacDonald, et al. 2010. « Postsynaptic Clustering and Activation of Pyk2 by PSD-95 ». *The Journal of Neuroscience* 30(2): 449-63.
- Basurto-Islas, Gustavo et al. 2008. « Accumulation of Aspartic Acid421- and Glutamic Acid391-Cleaved Tau in Neurofibrillary Tangles Correlates with Progression in Alzheimer Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 67(5): 470-83.
- Bateman, Randall J. et al. 2012. « Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease ». *The New England Journal of Medicine* 367(9): 795-804.
- Battistone, M. A. et al. 2014. « Evidence for the Involvement of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in Tyrosine Phosphorylation Downstream of Protein Kinase A Activation during Human Sperm Capacitation ». *Molecular Human Reproduction* 20(11): 1054-66.
- Beckman, Danielle et al. 2019. « Oligomeric A $\beta$  in the Monkey Brain Impacts Synaptic Integrity and Induces Accelerated Cortical Aging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(52): 26239-46.
- Beecham, Gary W. et al. 2014. « Genome-Wide Association Meta-Analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias » éd. Greg Gibson. *PLoS Genetics* 10(9): e1004606.
- Bekris, Lynn M., Chang-En Yu, Thomas D. Bird, et Debby W. Tsuang. 2010. « Genetics of Alzheimer Disease ». *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23(4): 213-27.
- Benbernou, N., K. Muegge, et S. K. Durum. 2000. « Interleukin (IL)-7 Induces Rapid Activation of Pyk2, Which Is Bound to Janus Kinase 1 and IL-7Ralpha ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(10): 7060-65.
- Benilova, Iryna, Eric Karran, et Bart De Strooper. 2012. « The Toxic A $\beta$  Oligomer and Alzheimer's Disease: An Emperor in Need of Clothes ». *Nature Neuroscience* 15(3): 349-57.
- Bennett, Rachel E. et al. 2017. « Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid  $\beta$  ». *The American Journal of Pathology* 187(7): 1601-12.
- von Bergen, M. et al. 2001. « Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local Beta-Structure ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(51): 48165-74.
- Bermudez, Yira, Hua Yang, Jin Q. Cheng, et Patricia A. Kruk. 2008. « Pyk2/ERK 1/2 Mediate Sp1- and c-Myc-Dependent Induction of Telomerase Activity by Epidermal Growth Factor ». *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 26(1): 1-11.

- Bhaskar, Kiran, Shu-Hui Yen, et Gloria Lee. 2005. « Disease-Related Modifications in Tau Affect the Interaction between Fyn and Tau ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(42): 35119-25.
- Biétry, Fabienne A. et al. 2017. « Benzodiazepine Use and Risk of Developing Alzheimer's Disease: A Case-Control Study Based on Swiss Claims Data ». *CNS drugs* 31(3): 245-51.
- Bittner, Tobias et al. 2012. « Amyloid Plaque Formation Precedes Dendritic Spine Loss ». *Acta Neuropathologica* 124(6): 797-807.
- Blaukat, A. et al. 1999. « Adaptor Proteins Grb2 and Crk Couple Pyk2 with Activation of Specific Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(21): 14893-901.
- Bongiorno-Borbone, Lucilla, Gress Kadaré, Fabio Benfenati, et Jean-Antoine Girault. 2005. « FAK and PYK2 Interact with SAP90/PSD-95-Associated Protein-3 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337(2): 641-46.
- Bordji, Karim, Javier Becerril-Ortega, Olivier Nicole, et Alain Buisson. 2010. « Activation of Extrasynaptic, but Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- $\beta$  Production ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(47): 15927-42.
- Bosson, Anthony et al. 2017. « TRPA1 Channels Promote Astrocytic Ca<sup>2+</sup> Hyperactivity and Synaptic Dysfunction Mediated by Oligomeric Forms of Amyloid- $\beta$  Peptide ». *Molecular Neurodegeneration* 12(1): 53.
- Bourgin, Caroline, Keith K. Murai, Melanie Richter, et Elena B. Pasquale. 2007. « The EphA4 Receptor Regulates Dendritic Spine Remodeling by Affecting B1-Integrin Signaling Pathways ». *The Journal of Cell Biology* 178(7): 1295-1307.
- Braak, H., et E. Braak. 1991. « Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes ». *Acta Neuropathologica* 82(4): 239-59.
- Brito-Moreira, J. et al. 2011. « A $\beta$  Oligomers Induce Glutamate Release from Hippocampal Neurons ». *Current Alzheimer Research* 8(5): 552-62.
- Brody, A. Harrison et al. 2022. « Alzheimer Risk Gene Product Pyk2 Suppresses Tau Phosphorylation and Phenotypic Effects of Tauopathy ». *Molecular Neurodegeneration* 17(1): 32.
- Brukman, Nicolás Gastón et al. 2019. « Tyrosine Phosphorylation Signaling Regulates Ca<sup>2+</sup> Entry by Affecting Intracellular pH during Human Sperm Capacitation ». *Journal of Cellular Physiology* 234(4): 5276-88.

- Brunden, Kurt R., John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. 2008. « Evidence That Non-Fibrillar Tau Causes Pathology Linked to Neurodegeneration and Behavioral Impairments ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 14(4): 393-99.
- Brunello, Cecilia A., Xu Yan, et Henri J. Huttunen. 2016. « Internalized Tau Sensitizes Cells to Stress by Promoting Formation and Stability of Stress Granules ». *Scientific Reports* 6: 30498.
- Bryan, J B, B W Nagle, et K H Doenges. 1975. « Inhibition of Tubulin Assembly by RNA and Other Polyanions: Evidence for a Required Protein. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(9): 3570-74.
- Buchhave, Peder et al. 2012. « Cerebrospinal Fluid Levels of  $\beta$ -Amyloid 1-42, but Not of Tau, Are Fully Changed Already 5 to 10 Years before the Onset of Alzheimer Dementia ». *Archives of General Psychiatry* 69(1): 98-106.
- Buckner, Randy L. et al. 2005. « Molecular, Structural, and Functional Characterization of Alzheimer's Disease: Evidence for a Relationship between Default Activity, Amyloid, and Memory ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(34): 7709-17.
- Burdick, Andrew D., Irena D. Ivnitski-Steele, Fredine T. Lauer, et Scott W. Burchiel. 2006. « PYK2 Mediates Anti-Apoptotic AKT Signaling in Response to Benzo[a]Pyrene Diol Epoxide in Mammary Epithelial Cells ». *Carcinogenesis* 27(11): 2331-40.
- Burdick, D. et al. 1992. « Assembly and Aggregation Properties of Synthetic Alzheimer's A4/Beta Amyloid Peptide Analogs ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(1): 546-54.
- Busche, Marc Aurel et al. 2008. « Clusters of Hyperactive Neurons near Amyloid Plaques in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 321(5896): 1686-89.
- Busche, Marc Aurel, et Arthur Konnerth. 2016. « Impairments of Neural Circuit Function in Alzheimer's Disease ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 371(1700): 20150429.
- Butterfield, D. Allan et al. 2002. « Oxidatively Induced Structural Alteration of Glutamine Synthetase Assessed by Analysis of Spin Label Incorporation Kinetics: Relevance to Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 68(6): 2451-57.
- Caccamo, Antonella, Salvatore Oddo, Lana X. Tran, et Frank M. LaFerla. 2007. « Lithium Reduces Tau Phosphorylation but Not A $\beta$  or Working Memory Deficits in a Transgenic Model with Both Plaques and Tangles ». *The American Journal of Pathology* 170(5): 1669-75.

- Camero, Sergio et al. 2014. « Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features Which Are Similar to Those Found in Histone-DNA Complex ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 39(3): 649-60.
- Cao, Zhengyu, Joju George, Daniel G. Baden, et Thomas F. Murray. 2007. « Brevetoxin-Induced Phosphorylation of Pyk2 and Src in Murine Neocortical Neurons Involves Distinct Signaling Pathways ». *Brain Research* 1184: 17-27.
- Cario, Alisa, et Christopher L. Berger. 2023. « Tau, Microtubule Dynamics, and Axonal Transport: New Paradigms for Neurodegenerative Disease ». *BioEssays* 45(8): 2200138.
- Castegna, Alessandra et al. 2002. « Proteomic Identification of Oxidatively Modified Proteins in Alzheimer's Disease Brain. Part I: Creatine Kinase BB, Glutamine Synthase, and Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L-1 ». *Free Radical Biology and Medicine* 33(4): 562-71.
- Castillo-Carranza, Diana L. et al. 2015. « Tau Immunotherapy Modulates Both Pathological Tau and Upstream Amyloid Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35(12): 4857-68.
- Castro, Paula, Shahid Zaman, et Anthony Holland. 2017. « Alzheimer's Disease in People with Down's Syndrome: The Prospects for and the Challenges of Developing Preventative Treatments ». *Journal of Neurology* 264(4): 804-13.
- Celone, Kim A. et al. 2006. « Alterations in Memory Networks in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: An Independent Component Analysis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26(40): 10222-31.
- Chabrier, Meredith A. et al. 2012. « Soluble A $\beta$  Promotes Wild-Type Tau Pathology in Vivo ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32(48): 17345-50.
- Chan, Gail et al. 2015. « CD33 Modulates TREM2: Convergence of Alzheimer Loci ». *Nature Neuroscience* 18(11): 1556-58.
- Chandrashekar, Devaraj V., Ross A. Steinberg, Derick Han, et Rachita K. Sumbria. 2023. « Alcohol as a Modifiable Risk Factor for Alzheimer's Disease-Evidence from Experimental Studies ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(11): 9492.
- Chellaiah, Meenakshi A., Dhandapani Kuppaswamy, Larry Lasky, et Stefan Linder. 2007. « Phosphorylation of a Wiscott-Aldrich Syndrome Protein-Associated Signal Complex Is Critical in Osteoclast Bone Resorption ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(13): 10104-16.

- Chen, Tianxiang et al. 2023. « HIF-1 $\alpha$ -Activated TMEM237 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via the NPHP1/Pyk2/ERK Pathway ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 80(5): 120.
- Cheung, Samuel M. S., et Hanne L. Ostergaard. 2016. « Pyk2 Controls Integrin-Dependent CTL Migration through Regulation of De-Adhesion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 197(5): 1945-56.
- Chin, Jeannie et al. 2004. « Fyn Kinase Modulates Synaptotoxicity, but Not Aberrant Sprouting, in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24(19): 4692-97.
- Chin, Jeannie et al. 2005. « Fyn Kinase Induces Synaptic and Cognitive Impairments in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(42): 9694-9703.
- Chin-Chan, Miguel, Juliana Navarro-Yepes, et Betzabet Quintanilla-Vega. 2015. « Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00124/abstract> (14 octobre 2023).
- Chishti, Athar H et al. 1998. « The FERM Domain: A Unique Module Involved in the Linkage of Cytoplasmic Proteins to the Membrane ». *Trends in Biochemical Sciences* 23(8): 281-82.
- Cho, Jae-Hyeon, et Gail V. W. Johnson. 2003. « Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Phosphorylates Tau at Both Primed and Unprimed Sites. Differential Impact on Microtubule Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(1): 187-93.
- Cirrito, John R. et al. 2003. « In Vivo Assessment of Brain Interstitial Fluid with Microdialysis Reveals Plaque-Associated Changes in Amyloid-Beta Metabolism and Half-Life ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23(26): 8844-53.
- Cirrito, John R. et al. 2005. « Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- $\beta$  Levels In Vivo ». *Neuron* 48(6): 913-22.
- Citri, Ami, et Robert C Malenka. 2008. « Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms ». *Neuropsychopharmacology* 33(1): 18-41.
- Citron, M. et al. 1992. « Mutation of the Beta-Amyloid Precursor Protein in Familial Alzheimer's Disease Increases Beta-Protein Production ». *Nature* 360(6405): 672-74.
- Clark, Michelle A., et Noelvly Gonzalez. 2007. « Src and Pyk2 Mediate Angiotensin II Effects in Cultured Rat Astrocytes ». *Regulatory Peptides* 143(1-3): 47-55.

- Cleary, James P et al. 2005. « Natural Oligomers of the Amyloid- $\beta$  Protein Specifically Disrupt Cognitive Function ». *Nature Neuroscience* 8(1): 79-84.
- Colom-Cadena, Martí et al. 2023. « Synaptic Oligomeric Tau in Alzheimer's Disease — A Potential Culprit in the Spread of Tau Pathology through the Brain ». *Neuron* 111(14): 2170-2183.e6.
- Combs, C. K. et al. 1999. « Identification of Microglial Signal Transduction Pathways Mediating a Neurotoxic Response to Amyloidogenic Fragments of Beta-Amyloid and Prion Proteins ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19(3): 928-39.
- Corder, E. H. et al. 1994. « Protective Effect of Apolipoprotein E Type 2 Allele for Late Onset Alzheimer Disease ». *Nature Genetics* 7(2): 180-84.
- Corvol, Jean-Christophe et al. 2005. « Depolarization Activates ERK and Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 (PYK2) Independently in Different Cellular Compartments in Hippocampal Slices ». *Journal of Biological Chemistry* 280(1): 660-68.
- Cowan, Catherine M., et Amrit Mudher. 2013. « Are Tau Aggregates Toxic or Protective in Tauopathies? » *Frontiers in Neurology* 4: 114.
- Cruz, Jonathan C. et al. 2003. « Aberrant Cdk5 Activation by P25 Triggers Pathological Events Leading to Neurodegeneration and Neurofibrillary Tangles ». *Neuron* 40(3): 471-83.
- Cummings, Jeffrey, Andrew Ortiz, Janelle Castellino, et Jefferson Kinney. 2022. « Diabetes: Risk Factor and Translational Therapeutic Implications for Alzheimer's Disease ». *The European Journal of Neuroscience* 56(9): 5727-57.
- Danbolt, Niels C. 2001. « Glutamate Uptake ». *Progress in Neurobiology* 65(1): 1-105.
- Davidson, D. 2001. « PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates ». *The EMBO Journal* 20(13): 3414-26.
- De Calignon, Alix et al. 2010. « Caspase Activation Precedes and Leads to Tangles ». *Nature* 464(7292): 1201-4.
- De Felice, Fernanda G. et al. 2008. « Alzheimer's Disease-Type Neuronal Tau Hyperphosphorylation Induced by A Beta Oligomers ». *Neurobiology of Aging* 29(9): 1334-47.
- De Vos, Kurt J., Andrew J. Grierson, Steven Ackerley, et Christopher C.J. Miller. 2008. « Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases ». *Annual Review of Neuroscience* 31(1): 151-73.

- Decker, Jochen Martin et al. 2015. « Pro-Aggregant Tau Impairs Mossy Fiber Plasticity Due to Structural Changes and Ca<sup>++</sup> Dysregulation ». *Acta Neuropathologica Communications* 3(1): 23.
- DeKosky, Steven T., et Stephen W. Scheff. 1990. « Synapse Loss in Frontal Cortex Biopsies in Alzheimer's Disease: Correlation with Cognitive Severity ». *Annals of Neurology* 27(5): 457-64.
- Derkinderen, Pascal et al. 2005. « Tyrosine 394 Is Phosphorylated in Alzheimer's Paired Helical Filament Tau and in Fetal Tau with c-Abl as the Candidate Tyrosine Kinase ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(28): 6584-93.
- Derouesne, C. et al. 1999. « [Mini-Mental State Examination:a useful method for the evaluation of the cognitive status of patients by the clinician. Consensual French version] ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 28(21): 1141-48.
- Dickerson, B. C. et al. 2005. « Increased Hippocampal Activation in Mild Cognitive Impairment Compared to Normal Aging and AD ». *Neurology* 65(3): 404-11.
- Dickson, D. W. et al. 1992. « Identification of Normal and Pathological Aging in Prospectively Studied Nondemented Elderly Humans ». *Neurobiology of Aging* 13(1): 179-89.
- Dikic, Ivan, Inga Dikic, et Joseph Schlessinger. 1998. « Identification of a New Pyk2 Isoform Implicated in Chemokine and Antigen Receptor Signaling ». *Journal of Biological Chemistry* 273(23): 14301-8.
- Dixit, Ram, Jennifer L. Ross, Yale E. Goldman, et Erika L. F. Holzbaur. 2008. « Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau ». *Science* 319(5866): 1086-89.
- Dolev, Iftach et al. 2013. « Spike Bursts Increase Amyloid- $\beta$  40/42 Ratio by Inducing a Presenilin-1 Conformational Change ». *Nature Neuroscience* 16(5): 587-95.
- Dourlen, P et al. 2017. « Functional Screening of Alzheimer Risk Loci Identifies PTK2B as an in Vivo Modulator and Early Marker of Tau Pathology ». *Molecular Psychiatry* 22(6): 874-83.
- Drechsel, D. N., A. A. Hyman, M. H. Cobb, et M. W. Kirschner. 1992. « Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau ». *Molecular Biology of the Cell* 3(10): 1141-54.
- Drewes, G. et al. 1995. « Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase (P110mark). A Novel Protein Kinase That Regulates Tau-Microtubule Interactions and Dynamic Instability by Phosphorylation at the Alzheimer-Specific Site Serine 262 ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(13): 7679-88.

- Du, Quan-Sheng et al. 2001. « Inhibition of PYK2-Induced Actin Cytoskeleton Reorganization, PYK2 Autophosphorylation and Focal Adhesion Targeting by FAK ». *Journal of Cell Science* 114(16): 2977-87.
- Dylla, Scott J. et al. 2004. « Integrin Engagement-Induced Inhibition of Human Myelopoiesis Is Mediated by Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Gene Products ». *Experimental Hematology* 32(4): 365-74.
- Ebneth, A. et al. 1998. « Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-Dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease ». *The Journal of Cell Biology* 143(3): 777-94.
- Eftekharzadeh, Bahareh et al. 2018. « Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease ». *Neuron* 99(5): 925-940.e7.
- Eidenmüller, J. et al. 2001. « Phosphorylation-Mimicking Glutamate Clusters in the Proline-Rich Region Are Sufficient to Simulate the Functional Deficiencies of Hyperphosphorylated Tau Protein ». *The Biochemical Journal* 357(Pt 3): 759-67.
- Eleniste, Pierre P. et al. 2016. « Pyk2 and Megakaryocytes Regulate Osteoblast Differentiation and Migration Via Distinct and Overlapping Mechanisms ». *Journal of Cellular Biochemistry* 117(6): 1396-1406.
- Elie, Auréliane et al. 2015. « Tau Co-Organizes Dynamic Microtubule and Actin Networks ». *Scientific Reports* 5: 9964.
- Engel, Tobias et al. 2006. « Chronic Lithium Administration to FTDP-17 Tau and GSK-3 $\beta$  Overexpressing Mice Prevents Tau Hyperphosphorylation and Neurofibrillary Tangle Formation, but Pre-Formed Neurofibrillary Tangles Do Not Revert ». *Journal of Neurochemistry* 99(6): 1445-55.
- Esquerda-Canals, Gisela, Laia Montoliu-Gaya, Jofre Güell-Bosch, et Sandra Villegas. 2017. « Mouse Models of Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 57(4): 1171-83.
- European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013. « Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease ». *Nature Genetics* 45(12): 1452-58.
- Fagg, G.E., et A.C. Foster. 1983. « Amino Acid Neurotransmitters and Their Pathways in the Mammalian Central Nervous System ». *Neuroscience* 9(4): 701-19.
- Fan, Li et al. 2018. « Alpha Protocadherins and Pyk2 Kinase Regulate Cortical Neuron Migration and Cytoskeletal Dynamics via Rac1 GTPase and WAVE Complex in Mice ». *eLife* 7: e35242.

- Fani, Giulia et al. 2021. « A $\beta$  Oligomers Dysregulate Calcium Homeostasis by Mechanosensitive Activation of AMPA and NMDA Receptors ». *ACS Chemical Neuroscience* 12(4): 766-81.
- Faure, Camille et al. 2007. « Calcineurin Is Essential for Depolarization-Induced Nuclear Translocation and Tyrosine Phosphorylation of PYK2 in Neurons ». *Journal of Cell Science* 120(17): 3034-44.
- Faure, Camille, Mariana Ramos, et Jean-Antoine Girault. 2013. « Pyk2 Cytonuclear Localization: Mechanisms and Regulation by Serine Dephosphorylation ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(1): 137-52.
- Feijoo, Carmen et al. 2005. « Evidence That Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau by SAPK4/P38delta at Thr50 Promotes Microtubule Assembly ». *Journal of Cell Science* 118(Pt 2): 397-408.
- Fein, Jeffrey A. et al. 2008. « Co-Localization of Amyloid Beta and Tau Pathology in Alzheimer's Disease Synaptosomes ». *The American Journal of Pathology* 172(6): 1683-92.
- Felsch, J. S., T. G. Cachero, et E. G. Peralta. 1998. « Activation of Protein Tyrosine Kinase PYK2 by the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9): 5051-56.
- Ferreira, Ildete Luísa et al. 2015. « A $\beta$  and NMDAR Activation Cause Mitochondrial Dysfunction Involving ER Calcium Release ». *Neurobiology of Aging* 36(2): 680-92.
- Fiedorek, F. T., et E. S. Kay. 1995. « Mapping of the Focal Adhesion Kinase (Fadk) Gene to Mouse Chromosome 15 and Human Chromosome 8 ». *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 6(2): 123-26.
- Filipcik, Peter et al. 2012. « First Transgenic Rat Model Developing Progressive Cortical Neurofibrillary Tangles ». *Neurobiology of Aging* 33(7): 1448-56.
- Fischer, Daniela et al. 2009. « Conformational Changes Specific for Pseudophosphorylation at Serine 262 Selectively Impair Binding of Tau to Microtubules ». *Biochemistry* 48(42): 10047-55.
- Fitzpatrick, Christopher James, et Paul J. Lombroso. 2011. « The Role of Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase (STEP) in Cognition ». *Frontiers in Neuroanatomy* 5. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2011.00047/abstract> (20 octobre 2023).
- Flores-Cordero, Juan Antonio et al. 2022. « Obesity as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: The Role of Leptin ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(9): 5202.

- Frandemiche, M. L. et al. 2014. « Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers ». *Journal of Neuroscience* 34(17): 6084-97.
- Fratiglioni, Laura, Stephanie Paillard-Borg, et Bengt Winblad. 2004. « An Active and Socially Integrated Lifestyle in Late Life Might Protect against Dementia ». *The Lancet. Neurology* 3(6): 343-53.
- Gamblin, T. Chris et al. 2003. « Caspase Cleavage of Tau: Linking Amyloid and Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(17): 10032-37.
- Ganju, R. K. et al. 2000. « Beta-Chemokine Receptor CCR5 Signals through SHP1, SHP2, and Syk ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(23): 17263-68.
- Ganju, Ramesh K. et al. 1997. « RAFTK, a Novel Member of the Focal Adhesion Kinase Family, Is Phosphorylated and Associates with Signaling Molecules upon Activation of Mature T Lymphocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 185(6): 1055-64.
- Garcia-Osta, Ana, et Cristina M. Alberini. 2009. « Amyloid Beta Mediates Memory Formation ». *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 16(4): 267-72.
- Gary, R., et A. Bretscher. 1995. « Ezrin Self-Association Involves Binding of an N-Terminal Domain to a Normally Masked C-Terminal Domain That Includes the F-Actin Binding Site ». *Molecular Biology of the Cell* 6(8): 1061-75.
- Gatz, Margaret et al. 2006. « Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease ». *Archives of General Psychiatry* 63(2): 168.
- Ghatak, Swagata et al. 2019. « Mechanisms of Hyperexcitability in Alzheimer's Disease hiPSC-Derived Neurons and Cerebral Organoids vs Isogenic Controls ». *eLife* 8: e50333.
- Ghisso, J et al. 1992. « A 109-Amino-Acid C -Terminal Fragment of Alzheimer's-Disease Amyloid Precursor Protein Contains a Sequence, -RHDS-, That Promotes Cell Adhesion ». *Biochemical Journal* 288(3): 1053-59.
- Gil-Henn, Hava, Jean-Antoine Girault, et Sima Lev. 2023. « PYK2, a Hub of Signaling Networks in Breast Cancer Progression ». *Trends in Cell Biology*: S0962-8924(23)00139-3.
- Giralt, Albert et al. 2017. « Pyk2 Modulates Hippocampal Excitatory Synapses and Contributes to Cognitive Deficits in a Huntington's Disease Model ». *Nature Communications* 8(1): 15592.
- Giralt, Albert et al. 2018. « PTK2B/Pyk2 Overexpression Improves a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Experimental Neurology* 307: 62-73.

- Giralt, Albert, Renata Coura, et Jean-Antoine Girault. 2016. « Pyk2 Is Essential for Astrocytes Mobility Following Brain Lesion: Pyk2 in Astrogliosis ». *Glia* 64(4): 620-34.
- Girault, J. A. et al. 1999. « FAK and PYK2/CAKbeta in the Nervous System: A Link between Neuronal Activity, Plasticity and Survival? » *Trends in Neurosciences* 22(6): 257-63.
- Girault, J. A., G. Labesse, J. P. Mornon, et I. Callebaut. 1998. « Janus Kinases and Focal Adhesion Kinases Play in the 4.1 Band: A Superfamily of Band 4.1 Domains Important for Cell Structure and Signal Transduction ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 4(12): 751-69.
- Girault, Jean-Antoine, Gilles Labesse, Jean-Paul Mornon, et Isabelle Callebaut. 1999. « The N-Termini of FAK and JAKs Contain Divergent Band 4.1 Domains ». *Trends in Biochemical Sciences* 24(2): 54-57.
- Giri, Mohan, Yang Lü, et Man Zhang. 2016. « Genes Associated with Alzheimer's Disease: An Overview and Current Status ». *Clinical Interventions in Aging*: 665.
- Gladding, Clare M. et al. 2009. « Tyrosine Dephosphorylation Regulates AMPAR Internalisation in mGluR-LTD ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 40(2): 267-79.
- Glennner, G. G., et C. W. Wong. 1984. « Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120(3): 885-90.
- Goedert, M. et al. 1989. « Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 3(4): 519-26.
- Goedert, M. et al. 1996. « Assembly of Microtubule-Associated Protein Tau into Alzheimer-like Filaments Induced by Sulphated Glycosaminoglycans ». *Nature* 383(6600): 550-53.
- Goedert, M., et R. Jakes. 1990. « Expression of Separate Isoforms of Human Tau Protein: Correlation with the Tau Pattern in Brain and Effects on Tubulin Polymerization. » *The EMBO Journal* 9(13): 4225-30.
- Golzari-Sorkheh, Mahdiah, Donald F. Weaver, et Mark A. Reed. 2023. « COVID-19 as a Risk Factor for Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 91(1): 1-23.
- Gómez De Barreda, Elena, Hana N. Dawson, Michel P. Vitek, et Jesús Avila. 2010. « Tau Deficiency Leads to the Upregulation of BAF-57, a Protein Involved in Neuron-Specific Gene Repression ». *FEBS Letters* 584(11): 2265-70.
- Gómez-Ramos, Pilar, et M. Asunción Morán. 2007. « Ultrastructural Localization of Intraneuronal Abeta-Peptide in Alzheimer Disease Brains ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 11(1): 53-59.

- Götz, J., F. Chen, J. Van Dorpe, et R. M. Nitsch. 2001. « Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A $\beta$ 42 Fibrils ». *Science* 293(5534): 1491-95.
- Gouras, Gunnar K. et al. 2000. « Intraneuronal A $\beta$ 42 Accumulation in Human Brain ». *The American Journal of Pathology* 156(1): 15-20.
- Grant, Seth G. N. et al. 1992. « Impaired Long-Term Potentiation, Spatial Learning, and Hippocampal Development in *Fyn* Mutant Mice ». *Science* 258(5090): 1903-10.
- Gravina, S. A. et al. 1995. « Amyloid Beta Protein (A Beta) in Alzheimer's Disease Brain. Biochemical and Immunocytochemical Analysis with Antibodies Specific for Forms Ending at A Beta 40 or A Beta 42(43) ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(13): 7013-16.
- Grundke-Iqbal, I et al. 1986. « Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(13): 4913-17.
- Grundke-Iqbal, I. et al. 1989. « Amyloid Protein and Neurofibrillary Tangles Coexist in the Same Neuron in Alzheimer Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(8): 2853-57.
- Grüning, Clara S.R. et al. 2014. « Alternative Conformations of the Tau Repeat Domain in Complex with an Engineered Binding Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 289(33): 23209-18.
- Gu, Y., F. Oyama, et Y. Ihara. 1996. « Tau Is Widely Expressed in Rat Tissues ». *Journal of Neurochemistry* 67(3): 1235-44.
- Guan, J. L., J. E. Trevithick, et R. O. Hynes. 1991. « Fibronectin/Integrin Interaction Induces Tyrosine Phosphorylation of a 120-kDa Protein ». *Cell Regulation* 2(11): 951-64.
- Gulisano, Walter et al. 2019. « Neuromodulatory Action of Picomolar Extracellular A $\beta$ 42 Oligomers on Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Synaptic Function and Memory ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 39(30): 5986-6000.
- Guo, Tong, Wendy Noble, et Diane P. Hanger. 2017. « Roles of Tau Protein in Health and Disease ». *Acta Neuropathologica* 133(5): 665-704.
- Gupta, Anandarup et al. 2003. « Leupaxin Is a Critical Adaptor Protein in the Adhesion Zone of the Osteoclast ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(4): 669-85.
- Gustke, N. et al. 1994. « Domains of Tau Protein and Interactions with Microtubules ». *Biochemistry* 33(32): 9511-22.

- Ha, Go Eun, et Eunji Cheong. 2017. « Spike Frequency Adaptation in Neurons of the Central Nervous System ». *Experimental Neurobiology* 26(4): 179-85.
- Haas, Laura T. et al. 2016. « Metabotropic Glutamate Receptor 5 Couples Cellular Prion Protein to Intracellular Signalling in Alzheimer's Disease ». *Brain: A Journal of Neurology* 139(Pt 2): 526-46.
- Haas, Laura T., et Stephen M. Strittmatter. 2016. « Oligomers of Amyloid  $\beta$  Prevent Physiological Activation of the Cellular Prion Protein-Metabotropic Glutamate Receptor 5 Complex by Glutamate in Alzheimer Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 291(33): 17112-21.
- Haglund, Kaisa et al. 2004. « Recruitment of Pyk2 and Cbl to Lipid Rafts Mediates Signals Important for Actin Reorganization in Growing Neurites ». *Journal of Cell Science* 117(12): 2557-68.
- Halfter, Ursula M., Zachary E. Derbyshire, et Richard R. Vaillancourt. 2005. « Interferon- $\gamma$ -Dependent Tyrosine Phosphorylation of MEKK4 via Pyk2 Is Regulated by Annexin II and SHP2 in Keratinocytes ». *Biochemical Journal* 388(1): 17-28.
- Hamada, K. et al. 2000. « Structural Basis of the Membrane-Targeting and Unmasking Mechanisms of the Radixin FERM Domain ». *The EMBO journal* 19(17): 4449-62.
- Han, Seungil et al. 2009. « Structural Characterization of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 (PYK2) Reveals a Unique (DFG-out) Conformation and Enables Inhibitor Design ». *The Journal of Biological Chemistry* 284(19): 13193-201.
- Hanger, Diane P. et al. 2007. « Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(32): 23645-54.
- Hanger, Diane P., Brian H. Anderton, et Wendy Noble. 2009. « Tau Phosphorylation: The Therapeutic Challenge for Neurodegenerative Disease ». *Trends in Molecular Medicine* 15(3): 112-19.
- Hanger, Diane P., et Selina Wray. 2010. « Tau Cleavage and Tau Aggregation in Neurodegenerative Disease ». *Biochemical Society Transactions* 38(4): 1016-20.
- Hanks, S. K., M. B. Calalb, M. C. Harper, et S. K. Patel. 1992. « Focal Adhesion Protein-Tyrosine Kinase Phosphorylated in Response to Cell Attachment to Fibronectin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(18): 8487-91.
- Hardy, J. A., et G. A. Higgins. 1992. « Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis ». *Science (New York, N.Y.)* 256(5054): 184-85.

- Harris, M. E. et al. 1996. « Amyloid Beta Peptide (25-35) Inhibits Na<sup>+</sup>-Dependent Glutamate Uptake in Rat Hippocampal Astrocyte Cultures ». *Journal of Neurochemistry* 67(1): 277-86.
- Harwood, Janet C. et al. 2021. « Defining Functional Variants Associated with Alzheimer's Disease in the Induced Immune Response ». *Brain Communications* 3(2): fcab083.
- Hashido, Masaya, Kenji Hayashi, Kenzo Hirose, et Masamitsu Iino. 2006. « Ca<sup>2+</sup> Lightning Conveys Cell-Cell Contact Information inside the Cells ». *EMBO reports* 7(11): 1117-23.
- He, Hai Jin et al. 2009. « The Proline-Rich Domain of Tau Plays a Role in Interactions with Actin ». *BMC cell biology* 10: 81.
- Hector, Audrey, et Jonathan Brouillette. 2020. « Hyperactivity Induced by Soluble Amyloid- $\beta$  Oligomers in the Early Stages of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13: 600084.
- Hefendehl, J. K. et al. 2016. « Mapping Synaptic Glutamate Transporter Dysfunction in Vivo to Regions Surrounding A $\beta$  Plaques by iGluSnFR Two-Photon Imaging ». *Nature Communications* 7: 13441.
- Heidinger, Valérie et al. 2002. « Metabotropic Glutamate Receptor 1-Induced Upregulation of NMDA Receptor Current: Mediation through the Pyk2/Src-Family Kinase Pathway in Cortical Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 22(13): 5452-61.
- Hering, Heike, et Morgan Sheng. 2001. « Dendritic Spines : Structure, Dynamics and Regulation ». *Nature Reviews Neuroscience* 2(12): 880-88.
- Hernandez, Ruben V. et al. 2005. « Differences in the Magnitude of Long-Term Potentiation Produced by Theta Burst and High Frequency Stimulation Protocols Matched in Stimulus Number ». *Brain Research Protocols* 15(1): 6-13.
- Herzog, H. et al. 1996. « Molecular Cloning and Assignment of FAK2, a Novel Human Focal Adhesion Kinase, to 8p11.2-P22 by Nonisotopic in Situ Hybridization ». *Genomics* 32(3): 484-86.
- Higa-Nakamine, Sayomi, Shiho Okitsu-Sakurayama, Shinichiro Kina, et Hideyuki Yamamoto. 2020. « Fyn-Mediated Phosphorylation of Pyk2 Promotes Its Activation and Dissociation Downstream of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor ». *The FEBS journal* 287(16): 3551-64.
- Hildebrand, J D, M D Schaller, et J T Parsons. 1993. « Identification of Sequences Required for the Efficient Localization of the Focal Adhesion Kinase, pp125FAK, to Cellular Focal Adhesions. » *The Journal of cell biology* 123(4): 993-1005.

- Hill, Emily, Mark J. Wall, Kevin G. Moffat, et Thomas K. Karikari. 2020. « Understanding the Pathophysiological Actions of Tau Oligomers: A Critical Review of Current Electrophysiological Approaches ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13: 155.
- Hirao, M. et al. 1996. « Regulation Mechanism of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Protein/Plasma Membrane Association: Possible Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-Dependent Signaling Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 135(1): 37-51.
- Hirokawa, N., Y. Shiomura, et S. Okabe. 1988. « Tau Proteins: The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules ». *The Journal of Cell Biology* 107(4): 1449-59.
- Hooper, Claudie, Richard Killick, et Simon Lovestone. 2008. « The GSK3 Hypothesis of Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 104(6): 1433-39.
- Hoover, Brian R. et al. 2010. « Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration ». *Neuron* 68(6): 1067-81.
- Horowitz, Peleg M. et al. 2004. « Early N-Terminal Changes and Caspase-6 Cleavage of Tau in Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24(36): 7895-7902.
- Howard, Robert et al. 2015. « Nursing Home Placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) Trial: Secondary and Post-Hoc Analyses ». *The Lancet Neurology* 14(12): 1171-81.
- Hsieh, Helen et al. 2006. « AMPAR Removal Underlies Abeta-Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss ». *Neuron* 52(5): 831-43.
- Hsin, Honor, Myung Jong Kim, Chi-Fong Wang, et Morgan Sheng. 2010. « Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Regulates Hippocampal Long-Term Depression ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(36): 11983-93.
- Huang, Chengmei et al. 2021. « Tumor Cell-Derived SPON2 Promotes M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage Infiltration and Cancer Progression by Activating PYK2 in CRC ». *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 40(1): 304.
- Huang, Y. et al. 2001. « CAKbeta/Pyk2 Kinase Is a Signaling Link for Induction of Long-Term Potentiation in CA1 Hippocampus ». *Neuron* 29(2): 485-96.
- Hye, Abdul et al. 2005. « Glycogen Synthase Kinase-3 Is Increased in White Cells Early in Alzheimer's Disease ». *Neuroscience Letters* 373(1): 1-4.
- Hyun, Jung Ho et al. 2013. « Activity-Dependent Downregulation of D-Type K<sup>+</sup> Channel Subunit Kv1.2 in Rat Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons: Ca<sup>2+</sup>-Dependent Downregulation of Kv1.2 ». *The Journal of Physiology* 591(22): 5525-40.

- Iso-Markku, Paula et al. 2022. « Physical Activity as a Protective Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: Systematic Review, Meta-Analysis and Quality Assessment of Cohort and Case-Control Studies ». *British Journal of Sports Medicine* 56(12): 701-9.
- Ittner, Lars M. et al. 2010. « Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- $\beta$  Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models ». *Cell* 142(3): 387-97.
- Ittner, Lars M., Yazi D. Ke, et Jürgen Götz. 2009. « Phosphorylated Tau Interacts with C-Jun N-Terminal Kinase-Interacting Protein 1 (JIP1) in Alzheimer Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 284(31): 20909-16.
- Ivankovic-Dikic, Inga et al. 2000. « Pyk2 and FAK Regulate Neurite Outgrowth Induced by Growth Factors and Integrins ». *Nature Cell Biology* 2(9): 574-81.
- Iwatsubo, T. et al. 1994. « Visualization of A Beta 42(43) and A Beta 40 in Senile Plaques with End-Specific A Beta Monoclonals: Evidence That an Initially Deposited Species Is A Beta 42(43) ». *Neuron* 13(1): 45-53.
- Jack, C. R. et al. 2000. « Rates of Hippocampal Atrophy Correlate with Change in Clinical Status in Aging and AD ». *Neurology* 55(4): 484-89.
- Jack, Clifford R. et al. 2012. « An Operational Approach to National Institute on Aging-Alzheimer's Association Criteria for Preclinical Alzheimer Disease ». *Annals of Neurology* 71(6): 765-75.
- Jack, Clifford R. et al. 2018. « NIA-AA Research Framework: Toward a Biological Definition of Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia* 14(4): 535-62.
- Jahn, Holger. 2013. « Memory Loss in Alzheimer's Disease ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 15(4): 445-54.
- Janning, Dennis et al. 2014. « Single-Molecule Tracking of Tau Reveals Fast Kiss-and-Hop Interaction with Microtubules in Living Neurons ». *Molecular Biology of the Cell* 25(22): 3541-51.
- Jarrett, Joseph T., Elizabeth P. Berger, et Peter T. Lansbury. 1993. « The Carboxy Terminus of the .Beta. Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Biochemistry* 32(18): 4693-97.
- Jeganathan, Sadasivam et al. 2006. « Global Hairpin Folding of Tau in Solution ». *Biochemistry* 45(7): 2283-93.
- Jiao, Bin et al. 2015. « Polygenic Analysis of Late-Onset Alzheimer's Disease from Mainland China » éd. Riqiang Yan. *PLOS ONE* 10(12): e0144898.

- Jin, Ming et al. 2011. « Soluble Amyloid Beta-Protein Dimers Isolated from Alzheimer Cortex Directly Induce Tau Hyperphosphorylation and Neuritic Degeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(14): 5819-24.
- Jonsson, Thorlakur et al. 2012. « A Mutation in APP Protects against Alzheimer's Disease and Age-Related Cognitive Decline ». *Nature* 488(7409): 96-99.
- Jorissen, Ellen et al. 2010. « The Disintegrin/Metalloproteinase ADAM10 Is Essential for the Establishment of the Brain Cortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(14): 4833-44.
- Josephs, Keith A. et al. 2015. « TAR DNA-Binding Protein 43 and Pathological Subtype of Alzheimer's Disease Impact Clinical Features ». *Annals of Neurology* 78(5): 697-709.
- Jucker, Mathias, et Lary C. Walker. 2013. « Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases ». *Nature* 501(7465): 45-51.
- Kacena, Melissa A. et al. 2012. « Megakaryocytes Regulate Expression of Pyk2 Isoforms and Caspase-Mediated Cleavage of Actin in Osteoblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(21): 17257-68.
- Kadavath, Harindranath et al. 2015. « Tau Stabilizes Microtubules by Binding at the Interface between Tubulin Heterodimers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(24): 7501-6.
- Kanaan, Nicholas M. et al. 2011. « Pathogenic Forms of Tau Inhibit Kinesin-Dependent Axonal Transport through a Mechanism Involving Activation of Axonal Phosphotransferases ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31(27): 9858-68.
- Kanaan, Nicholas M. et al. 2012. « Phosphorylation in the Amino Terminus of Tau Prevents Inhibition of Anterograde Axonal Transport ». *Neurobiology of Aging* 33(4): 826.e15-826.e30.
- Kanner, S. B., A. Aruffo, et P. Y. Chan. 1994. « Lymphocyte Antigen Receptor Activation of a Focal Adhesion Kinase-Related Tyrosine Kinase Substrate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(22): 10484-87.
- Kaufman, Adam C. et al. 2015. « Fyn Inhibition Rescues Established Memory and Synapse Loss in Alzheimer Mice: Fyn Inhibition by AZD0530 ». *Annals of Neurology* 77(6): 953-71.
- Kent, Sarah A., Tara L. Spires-Jones, et Claire S. Durrant. 2020. « The Physiological Roles of Tau and A $\beta$ : Implications for Alzheimer's Disease Pathology and Therapeutics ». *Acta Neuropathologica* 140(4): 417-47.

- Keogh, Rosemary J., Rebecca A. Houliston, et Caroline P. D. Wheeler-Jones. 2002. « Human Endothelial Pyk2 Is Expressed in Two Isoforms and Associates with Paxillin and p130Cas ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(5): 1470-77.
- Kervern, Myriam et al. 2012. « Selective Impairment of Some Forms of Synaptic Plasticity by Oligomeric Amyloid- $\beta$  Peptide in the Mouse Hippocampus: Implication of Extrasynaptic NMDA Receptors ». *Journal of Alzheimer's Disease* 32(1): 183-96.
- Kilinc, Devrim et al. 2020. « Pyk2 Overexpression in Postsynaptic Neurons Blocks Amyloid B1–42-Induced Synaptotoxicity in Microfluidic Co-Cultures ». *Brain Communications* 2(2): fcaa139.
- Kimura, Tetsuya et al. 2014. « Microtubule-Associated Protein Tau Is Essential for Long-Term Depression in the Hippocampus ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369(1633): 20130144.
- Kinoshita, Ayae et al. 2003. « Demonstration by FRET of BACE Interaction with the Amyloid Precursor Protein at the Cell Surface and in Early Endosomes ». *Journal of Cell Science* 116(16): 3339-46.
- Ko, Soyeon et al. 2022. « A Novel DDR1 Inhibitor Enhances the Anticancer Activity of Gemcitabine in Pancreatic Cancer ». *American Journal of Cancer Research* 12(9): 4326-42.
- Koch, Philipp et al. 2012. « Presenilin-1 L166P Mutant Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons Exhibit Partial Loss of  $\gamma$ -Secretase Activity in Endogenous Amyloid- $\beta$  Generation ». *The American Journal of Pathology* 180(6): 2404-16.
- Köhler, Christoph, Maja Dinekov, et Jürgen Götz. 2013. « Active Glycogen Synthase Kinase-3 and Tau Pathology-Related Tyrosine Phosphorylation in pR5 Human Tau Transgenic Mice ». *Neurobiology of Aging* 34(5): 1369-79.
- Kohno, Takayuki, Eiko Matsuda, Hiroko Sasaki, et Terukatsu Sasaki. 2008. « Protein-Tyrosine Kinase CAK $\beta$ /PYK2 Is Activated by Binding Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin to FERM F2 A2 Helix and Thus Forming Its Dimer ». *Biochemical Journal* 410(3): 513-23.
- Koo, E H et al. 1990. « Precursor of Amyloid Protein in Alzheimer Disease Undergoes Fast Anterograde Axonal Transport. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(4): 1561-65.
- Köpke, E. et al. 1993. « Microtubule-Associated Protein Tau. Abnormal Phosphorylation of a Non-Paired Helical Filament Pool in Alzheimer Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 268(32): 24374-84.
- Kosik, K. S., L. D. Orecchio, S. Bakalis, et R. L. Neve. 1989. « Developmentally Regulated Expression of Specific Tau Sequences ». *Neuron* 2(4): 1389-97.

- Kumar, Rahul, Vishvanath Tiwari, et Sharmistha Dey. 2022. « Role of Proline-rich Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *European Journal of Neuroscience* 56(9): 5442-52.
- Kumar, Shailendra et al. 1999. « Negative Regulation of PYK2/Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase Signal Transduction by Hematopoietic Tyrosine Phosphatase SHPTP1 ». *Journal of Biological Chemistry* 274(43): 30657-63.
- Kurup, Pradeep et al. 2010. « A $\beta$ -Mediated NMDA Receptor Endocytosis in Alzheimer's Disease Involves Ubiquitination of the Tyrosine Phosphatase STEP<sub>61</sub> ». *The Journal of Neuroscience* 30(17): 5948-57.
- LaFerla, Frank M., Kim N. Green, et Salvatore Oddo. 2007. « Intracellular Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease ». *Nature Reviews Neuroscience* 8(7): 499-509.
- Lakkakorpi, Pärvi T. et al. 2003. « PYK2 Autophosphorylation, but Not Kinase Activity, Is Necessary for Adhesion-Induced Association with c-Src, Osteoclast Spreading, and Bone Resorption ». *Journal of Biological Chemistry* 278(13): 11502-12.
- Lambert, M. P. et al. 1998. « Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from Abeta1-42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11): 6448-53.
- LaPointe, Nichole E. et al. 2009. « The Amino Terminus of Tau Inhibits Kinesin-Dependent Axonal Transport: Implications for Filament Toxicity ». *Journal of Neuroscience Research* 87(2): 440-51.
- Lathuilière, Aurélien et al. 2017. « Motifs in the Tau Protein That Control Binding to Microtubules and Aggregation Determine Pathological Effects ». *Scientific Reports* 7(1): 13556.
- Lau, C. Geoffrey et al. 2009. « Regulation of NMDA Receptor Ca<sup>2+</sup> Signalling and Synaptic Plasticity ». *Biochemical Society Transactions* 37(Pt 6): 1369-74.
- Lawingco, Ted et al. 2021. « Genetic Variants in Glutamate-, A $\beta$ -, and Tau-Related Pathways Determine Polygenic Risk for Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 101: 299.e13-299.e21.
- Lawson, Campbell D., et Anne J. Ridley. 2018. « Rho GTPase Signaling Complexes in Cell Migration and Invasion ». *The Journal of Cell Biology* 217(2): 447-57.
- Le, Hoa T., Lola Maksumova, Jing Wang, et Catherine J. Pallen. 2006. « Reduced NMDA Receptor Tyrosine Phosphorylation in PTP $\alpha$ -deficient Mouse Synaptosomes Is Accompanied by Inhibition of Four Src Family Kinases and Pyk2: An Upstream Role for PTP $\alpha$  in NMDA Receptor Regulation ». *Journal of Neurochemistry* 98(6): 1798-1809.

- Lebouvier, Thibaud et al. 2008. « The Microtubule-Associated Protein Tau Is Phosphorylated by Syk ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783(2): 188-92.
- Lee, G. et al. 1998. « Tau Interacts with Src-Family Non-Receptor Tyrosine Kinases ». *Journal of Cell Science* 111 ( Pt 21): 3167-77.
- Lee, G., et S. L. Rook. 1992. « Expression of Tau Protein in Non-Neuronal Cells: Microtubule Binding and Stabilization ». *Journal of Cell Science* 102 ( Pt 2): 227-37.
- Lee, Gloria et al. 2004. « Phosphorylation of Tau by Fyn: Implications for Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24(9): 2304-12.
- Lee, Hye Rin et al. 2014. « Cilostazol Suppresses  $\beta$ -Amyloid Production by Activating a Disintegrin and Metalloproteinase 10 via the Upregulation of SIRT1-Coupled Retinoic Acid Receptor- $\beta$  ». *Journal of Neuroscience Research* 92(11): 1581-90.
- Lee, Suho, Santiago V. Salazar, Timothy O. Cox, et Stephen M. Strittmatter. 2019. « Pyk2 Signaling through Graf1 and RhoA GTPase Is Required for Amyloid- $\beta$  Oligomer-Triggered Synapse Loss ». *The Journal of Neuroscience* 39(10): 1910-29.
- Lee, V. M., M. Goedert, et J. Q. Trojanowski. 2001. « Neurodegenerative Tauopathies ». *Annual Review of Neuroscience* 24: 1121-59.
- Lefebvre, Tony et al. 2003. « Evidence of a Balance between Phosphorylation and O-GlcNAc Glycosylation of Tau Proteins--a Role in Nuclear Localization ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1619(2): 167-76.
- Lei, Peng et al. 2014. « Motor and Cognitive Deficits in Aged Tau Knockout Mice in Two Background Strains ». *Molecular Neurodegeneration* 9(1): 29.
- Lennon, Matthew J., Rebecca Koncz, et Perminder S. Sachdev. 2021. « Hypertension and Alzheimer's Disease: Is the Picture Any Clearer? ». *Current Opinion in Psychiatry* 34(2): 142-48.
- Leroy, K., Z. Yilmaz, et J.-P. Brion. 2007. « Increased Level of Active GSK-3 $\beta$  in Alzheimer's Disease and Accumulation in Argyrophilic Grains and in Neurones at Different Stages of Neurofibrillary Degeneration ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33(1): 43-55.
- Lesné, Sylvain et al. 2006. « A Specific Amyloid- $\beta$  Protein Assembly in the Brain Impairs Memory ». *Nature* 440(7082): 352-57.
- Lesourd, Mathieu et al. 2013. « Apraxia and Alzheimer's Disease: Review and Perspectives ». *Neuropsychology Review* 23(3): 234-56.

- Lev, S. et al. 1995. « Protein Tyrosine Kinase PYK2 Involved in Ca(2+)-Induced Regulation of Ion Channel and MAP Kinase Functions ». *Nature* 376(6543): 737-45.
- Lewis, Jada et al. 2001. « Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP ». *Science* 293(5534): 1487-91.
- Li, Chuanzhou, et Jürgen Götz. 2017. « Somatodendritic Accumulation of Tau in Alzheimer's Disease Is Promoted by Fyn-Mediated Local Protein Translation ». *The EMBO journal* 36(21): 3120-38.
- Li, Chuanzhou, et Jürgen Götz. 2018. « Pyk2 Is a Novel Tau Tyrosine Kinase That Is Regulated by the Tyrosine Kinase Fyn » éd. P. Hemachandra Reddy. *Journal of Alzheimer's Disease* 64(1): 205-21.
- Li, Shaomin et al. 2009. « Soluble Oligomers of Amyloid Beta Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake ». *Neuron* 62(6): 788-801.
- Li, Shaomin et al. 2011. « Soluble A $\beta$  Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors ». *The Journal of Neuroscience* 31(18): 6627-38.
- Li, Shaomin, et Dennis J. Selkoe. 2020. « A Mechanistic Hypothesis for the Impairment of Synaptic Plasticity by Soluble A $\beta$  Oligomers from Alzheimer's Brain ». *Journal of Neurochemistry* 154(6): 583-97.
- Li, Shaoying et al. 2004. « Pyk2 Activation Is Integral to Acid Stimulation of Sodium/Hydrogen Exchanger 3 ». *Journal of Clinical Investigation* 114(12): 1782-89.
- Li, X. et al. 1999. « Interactions between Two Cytoskeleton-Associated Tyrosine Kinases: Calcium-Dependent Tyrosine Kinase and Focal Adhesion Tyrosine Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(13): 8917-24.
- Lim, Ssang-Taek et al. 2008. « Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced P53 Degradation ». *Molecular Cell* 29(1): 9-22.
- Lim, Ssang-Taek et al. 2010. « Pyk2 Inhibition of P53 as an Adaptive and Intrinsic Mechanism Facilitating Cell Proliferation and Survival ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(3): 1743-53.
- Lim, Yangmi et al. 2008. « PyK2 and FAK Connections to p190Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulate RhoA Activity, Focal Adhesion Formation, and Cell Motility ». *The Journal of Cell Biology* 180(1): 187-203.

- Limon, Agenor, Jorge Mauricio Reyes-Ruiz, et Ricardo Miledi. 2012. « Loss of Functional GABA(A) Receptors in the Alzheimer Diseased Brain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(25): 10071-76.
- Lin, Chih-Chung et al. 2018. « Arachidonic Acid Induces ARE/Nrf2-Dependent Heme Oxygenase-1 Transcription in Rat Brain Astrocytes ». *Molecular Neurobiology* 55(4): 3328-43.
- Lin, Chiou-Feng et al. 2008. « IFN-Gamma Synergizes with LPS to Induce Nitric Oxide Biosynthesis through Glycogen Synthase Kinase-3-Inhibited IL-10 ». *Journal of Cellular Biochemistry* 105(3): 746-55.
- Ling, Shizhang, Jian-Zhong Sheng, et Andrew P. Braun. 2004. « The Calcium-Dependent Activity of Large-Conductance, Calcium-Activated K<sup>+</sup> Channels Is Enhanced by Pyk2- and Hck-Induced Tyrosine Phosphorylation ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287(3): C698-706.
- Litersky, J. M. et al. 1996. « Tau Protein Is Phosphorylated by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II within Its Microtubule-Binding Domains at Ser-262 and Ser-356 ». *The Biochemical Journal* 316 ( Pt 2)(Pt 2): 655-60.
- Liu, Fei, Khalid Iqbal, et al. 2005. « Dephosphorylation of Tau by Protein Phosphatase 5 ». *Journal of Biological Chemistry* 280(3): 1790-96.
- Liu, Fei et al. 2007. « Site-Specific Effects of Tau Phosphorylation on Its Microtubule Assembly Activity and Self-Aggregation ». *The European Journal of Neuroscience* 26(12): 3429-36.
- Liu, Fei, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, et Cheng-Xin Gong. 2005. « Contributions of Protein Phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the Regulation of Tau Phosphorylation ». *The European Journal of Neuroscience* 22(8): 1942-50.
- Liu, Ziqing et al. 2017. « Systematic Comparison of 2A Peptides for Cloning Multi-Genes in a Polycistronic Vector ». *Scientific Reports* 7(1): 2193.
- Llorens-Martin, María et al. 2012. « Tau Isoform with Three Microtubule Binding Domains Is a Marker of New Axons Generated from the Subgranular Zone in the Hippocampal Dentate Gyrus: Implications for Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 29(4): 921-30.
- Loftus, Joseph C. et al. 2013. « A Novel Interaction between Pyk2 and MAP4K4 Is Integrated with Glioma Cell Migration ». *Journal of Signal Transduction* 2013: 956580.

- Lombroso, Paul J., Marilee Ogren, Pradeep Kurup, et Angus C. Nairn. 2016. « Molecular Underpinnings of Neurodegenerative Disorders: Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase Signaling and Synaptic Plasticity ». *F1000Research* 5: 2932.
- Loomis, P. A., T. H. Howard, R. P. Castleberry, et L. I. Binder. 1990. « Identification of Nuclear Tau Isoforms in Human Neuroblastoma Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(21): 8422-26.
- LoPresti, P. et al. 1995. « Functional Implications for the Microtubule-Associated Protein Tau: Localization in Oligodendrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(22): 10369-73.
- Lovestone, S., C. L. Hartley, J. Pearce, et B. H. Anderton. 1996. « Phosphorylation of Tau by Glycogen Synthase Kinase-3 Beta in Intact Mammalian Cells: The Effects on the Organization and Stability of Microtubules ». *Neuroscience* 73(4): 1145-57.
- Loving, Hanna S., et Eric S. Underbakke. 2019. « Conformational Dynamics of FERM-Mediated Autoinhibition in Pyk2 Tyrosine Kinase ». *Biochemistry* 58(36): 3767-76.
- Lu, Y. M., J. C. Roder, J. Davidow, et M. W. Salter. 1998. « Src Activation in the Induction of Long-Term Potentiation in CA1 Hippocampal Neurons ». *Science (New York, N.Y.)* 279(5355): 1363-67.
- Lu, Yang et al. 2013. « Hyperphosphorylation Results in Tau Dysfunction in DNA Folding and Protection ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 37(3): 551-63.
- Lulo, James, Satoru Yuzawa, et Joseph Schlessinger. 2009. « Crystal Structures of Free and Ligand-Bound Focal Adhesion Targeting Domain of Pyk2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383(3): 347-52.
- Lyons, Patrick D., Jill M. Dunty, Erik M. Schaefer, et Michael D. Schaller. 2001. « Inhibition of the Catalytic Activity of Cell Adhesion Kinase  $\beta$  by Protein-Tyrosine Phosphatase-PEST-Mediated Dephosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 276(26): 24422-31.
- Lysechko, Tara L., Samuel M. S. Cheung, et Hanne L. Ostergaard. 2010. « Regulation of the Tyrosine Kinase Pyk2 by Calcium Is through Production of Reactive Oxygen Species in Cytotoxic T Lymphocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(41): 31174-84.
- Ma, Qiu-Lan et al. 2014. « Loss of MAP Function Leads to Hippocampal Synapse Loss and Deficits in the Morris Water Maze with Aging ». *The Journal of Neuroscience* 34(21): 7124-36.
- Magnani, Enrico et al. 2007. « Interaction of Tau Protein with the Dynactin Complex ». *The EMBO journal* 26(21): 4546-54.

- Mahoney-Sanchez, Laura, Abdel Ali Belaidi, Ashley I. Bush, et Scott Ayton. 2016. « The Complex Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Overview and Update ». *Journal of molecular neuroscience: MN* 60(3): 325-35.
- Maina, Mahmoud B. et al. 2018. « The Involvement of Tau in Nucleolar Transcription and the Stress Response ». *Acta Neuropathologica Communications* 6(1): 70.
- Mairet-Coello, Georges et al. 2013. « The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A $\beta$  Oligomers through Tau Phosphorylation ». *Neuron* 78(1): 94-108.
- Manczak, Maria, et P. Hemachandra Reddy. 2013. « Abnormal Interaction of Oligomeric Amyloid- $\beta$  with Phosphorylated Tau: Implications to Synaptic Dysfunction and Neuronal Damage ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 36(2): 285-95.
- Mariappan, Meenalakshmi M. et al. 2014. « Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Ameliorates Diabetes-Induced Kidney Injury ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(51): 35363-75.
- Martin, Ludovic, Xenia Latypova, et Faraj Terro. 2011. « Post-Translational Modifications of Tau Protein: Implications for Alzheimer's Disease ». *Neurochemistry International* 58(4): 458-71.
- Masliah, E. et al. 1996. « Deficient Glutamate Transport Is Associated with Neurodegeneration in Alzheimer's Disease ». *Annals of Neurology* 40(5): 759-66.
- Mastrolia, Vincenzo, Omar al Massadi, Benoit de Pins, et Jean-Antoine Girault. 2021. « Pyk2 in Dorsal Hippocampus Plays a Selective Role in Spatial Memory and Synaptic Plasticity ». *Scientific Reports* 11(1): 16357.
- Matsui, Akihiro et al. 2007. « Central Role of Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Mediated Angiogenic Response and Vascular Function ». *Circulation* 116(9): 1041-51.
- Maurer, Konrad, Stephan Volk, et Hector Gerbaldo. 1997. « Auguste D and Alzheimer's Disease ». *The Lancet* 349(9064): 1546-49.
- McLean, C. A. et al. 1999. « Soluble Pool of Abeta Amyloid as a Determinant of Severity of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease ». *Annals of Neurology* 46(6): 860-66.
- Mecca, Adam P. et al. 2022. « Synaptic Density and Cognitive Performance in Alzheimer's Disease: A PET Imaging Study with [ <sup>11</sup> C ]UCB-J ». *Alzheimer's & Dementia* 18(12): 2527-36.

- Melendez, Jaime et al. 2004. « Cardiomyocyte Apoptosis Triggered by RAFTK/Pyk2 via Src Kinase Is Antagonized by Paxillin ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(51): 53516-23.
- Menegon, Andrea et al. 1999. « FAK<sup>+</sup> and PYK2/CAK $\beta$ , Two Related Tyrosine Kinases Highly Expressed in the Central Nervous System: Similarities and Differences in the Expression Pattern: FAK<sup>+</sup> and PYK2/CAK $\beta$  in Rat Brain ». *European Journal of Neuroscience* 11(11): 3777-88.
- Metuzals, J. et al. 1988. « Paired Helical Filaments and the Cytoplasmic-Nuclear Interface in Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurocytology* 17(6): 827-33.
- Miao, Lei et al. 2016. « Hydrogen Sulfide Recruits Macrophage Migration by Integrin B1-Src-FAK/Pyk2-Rac Pathway in Myocardial Infarction ». *Scientific Reports* 6: 22363.
- Millecamps, Stéphanie, et Jean-Pierre Julien. 2013. « Axonal Transport Deficits and Neurodegenerative Diseases ». *Nature Reviews. Neuroscience* 14(3): 161-76.
- Miller, Barbara A. et al. 2019. « Trpm2 Enhances Physiological Bioenergetics and Protects against Pathological Oxidative Cardiac Injury: Role of Pyk2 Phosphorylation ». *Journal of Cellular Physiology* 234(9): 15048-60.
- Miller, D. L. et al. 1993. « Peptide Compositions of the Cerebrovascular and Senile Plaque Core Amyloid Deposits of Alzheimer's Disease ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301(1): 41-52.
- Miller, Eric C. et al. 2014. « Tau Phosphorylation and Tau Mislocalization Mediate Soluble A $\beta$  Oligomer-Induced AMPA Glutamate Receptor Signaling Deficits ». *The European Journal of Neuroscience* 39(7): 1214-24.
- Miller, S. L. et al. 2008. « Hippocampal Activation in Adults with Mild Cognitive Impairment Predicts Subsequent Cognitive Decline ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79(6): 630-35.
- Miyazaki, T. et al. 1998. « Pyk2 Is a Downstream Mediator of the IL-2 Receptor-Coupled Jak Signaling Pathway ». *Genes & Development* 12(6): 770-75.
- Mizuguchi, Masashi, Kazuhiko Ikeda, et Seung U. Kim. 1992. « Differential Distribution of Cellular Forms of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Murine Glial Cell Cultures ». *Brain Research* 584(1-2): 219-25.
- Mograb, Daniel C., et Robin G. Morris. 2014. « On the Relation among Mood, Apathy, and Anosognosia in Alzheimer's Disease ». *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS* 20(1): 2-7.

- Momin, Afaque A. et al. 2022. « PYK2 Senses Calcium through a Disordered Dimerization and Calmodulin-Binding Element ». *Communications Biology* 5(1): 800.
- Mondragón-Rodríguez, Siddhartha et al. 2012. « Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Tau Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(38): 32040-53.
- Mookherjee, Paramita et al. 2011. « GLT-1 Loss Accelerates Cognitive Deficit Onset in an Alzheimer's Disease Animal Model ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 26(3): 447-55.
- Moreno, H. et al. 2016. « Tau Pathology-Mediated Presynaptic Dysfunction ». *Neuroscience* 325: 30-38.
- Mori, H., K. Takio, M. Ogawara, et D. J. Selkoe. 1992. « Mass Spectrometry of Purified Amyloid Beta Protein in Alzheimer's Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(24): 17082-86.
- Morley, John E. et al. 2010. « A Physiological Role for Amyloid-Beta Protein: Enhancement of Learning and Memory ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 19(2): 441-49.
- Morris, Meaghan et al. 2013. « Age-Appropriate Cognition and Subtle Dopamine-Independent Motor Deficits in Aged Tau Knockout Mice ». *Neurobiology of Aging* 34(6): 1523-29.
- Mukrasch, Marco D. et al. 2009. « Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution ». *PLoS biology* 7(2): e34.
- Müller, R. et al. 1997. « Expression of Microtubule-Associated Proteins MAP2 and Tau in Cultured Rat Brain Oligodendrocytes ». *Cell and Tissue Research* 288(2): 239-49.
- Muz, Barbara et al. 2019. « PYK2/FAK Inhibitors Reverse Hypoxia-Induced Drug Resistance in Multiple Myeloma ». *Haematologica* 104(7): e310-13.
- Nakazawa, T. et al. 2001. « Characterization of Fyn-Mediated Tyrosine Phosphorylation Sites on GluR Epsilon 2 (NR2B) Subunit of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(1): 693-99.
- Nesti, Edmund, Brian Everill, et Anthony D. Morielli. 2004. « Endocytosis as a Mechanism for Tyrosine Kinase-Dependent Suppression of a Voltage-Gated Potassium Channel ». *Molecular Biology of the Cell* 15(9): 4073-88.
- Nettiksimmons, Jasmine et al. 2016. « Gene-Based Aggregate SNP Associations between Candidate AD Genes and Cognitive Decline ». *AGE* 38(2): 41.
- Neve, Rachael L. et al. 1986. « Identification of cDNA Clones for the Human Microtubule-Associated Protein Tau and Chromosomal Localization of the Genes for Tau and Microtubule-Associated Protein 2 ». *Molecular Brain Research* 1(3): 271-80.

- Nicoll, Roger A. 2017. « A Brief History of Long-Term Potentiation ». *Neuron* 93(2): 281-90.
- Nies, Sarah Helena et al. 2021. « Spreading of Alzheimer Tau Seeds Is Enhanced by Aging and Template Matching with Limited Impact of Amyloid- $\beta$  ». *Journal of Biological Chemistry* 297(4): 101159.
- Nisbet, Rebecca M., Juan-Carlos Polanco, Lars M. Ittner, et Jürgen Götz. 2015. « Tau Aggregation and Its Interplay with Amyloid- $\beta$  ». *Acta Neuropathologica* 129(2): 207-20.
- O'Brien, Richard J., et Philip C. Wong. 2011. « Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease ». *Annual Review of Neuroscience* 34(1): 185-204.
- Oddo, Salvatore et al. 2003. « Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles ». *Neuron* 39(3): 409-21.
- O'Dell, T. J., E. R. Kandel, et S. G. Grant. 1991. « Long-Term Potentiation in the Hippocampus Is Blocked by Tyrosine Kinase Inhibitors ». *Nature* 353(6344): 558-60.
- Ohmori, T. et al. 1999. « Suppression of Protein Kinase C Is Associated with Inhibition of PYK2 Tyrosine Phosphorylation and Enhancement of PYK2 Interaction with Src in Thrombin-Activated Platelets ». *Thrombosis Research* 93(6): 291-98.
- Ohtsu, Haruhiko et al. 2005. « Signal-Crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-Terminal Kinase Mediates Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Stimulated by Angiotensin II ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(9): 1831-36.
- Okigaki, M. et al. 2003. « Pyk2 Regulates Multiple Signaling Events Crucial for Macrophage Morphology and Migration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19): 10740-45.
- Okitsu-Sakurayama, Shiho et al. 2019. « Activation of Pyk2 by CaM Kinase II in Cultured Hypothalamic Neurons and Gonadotroph Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 234(5): 6865-75.
- Olsson, Bob et al. 2016. « CSF and Blood Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *The Lancet. Neurology* 15(7): 673-84.
- Ossovskaya, Valeria et al. 2008. « FAK Nuclear Export Signal Sequences ». *FEBS letters* 582(16): 2402-6.
- Owen, Katherine A., Keena S. Thomas, et Amy H. Bouton. 2007. « The Differential Expression of Yersinia Pseudotuberculosis Adhesins Determines the Requirement for FAK and/or Pyk2 during Bacterial Phagocytosis by Macrophages ». *Cellular Microbiology* 9(3): 596-609.

- Palhano Zanela, Tania M., Alexzandrea Woudenberg, Karen G. Romero Bello, et Eric S. Underbakke. 2023. « Activation Loop Phosphorylation Tunes Conformational Dynamics Underlying Pyk2 Tyrosine Kinase Activation ». *Structure* 31(4): 447-454.e5.
- Palop, Jorge J. et al. 2007. « Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 55(5): 697-711.
- Panda, Dulal et al. 2003. « Differential Regulation of Microtubule Dynamics by Three- and Four-Repeat Tau: Implications for the Onset of Neurodegenerative Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(16): 9548-53.
- Papasozomenos, S. C., et L. I. Binder. 1987. « Phosphorylation Determines Two Distinct Species of Tau in the Central Nervous System ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 8(3): 210-26.
- Park, Shin-Young, Hava Avraham, et Shalom Avraham. 2000. « Characterization of the Tyrosine Kinases RAFTK/Pyk2 and FAK in Nerve Growth Factor-Induced Neuronal Differentiation ». *Journal of Biological Chemistry* 275(26): 19768-77.
- Park, Shin-Young, Hava Karsenty Avraham, et Shalom Avraham. 2004. « RAFTK/Pyk2 Activation Is Mediated by Trans-Acting Autophosphorylation in a Src-Independent Manner ». *Journal of Biological Chemistry* 279(32): 33315-22.
- Parpura-Gill, Aleksandra, Donald Beitz, et Etsuro Uemura. 1997. « The Inhibitory Effects of  $\beta$ -Amyloid on Glutamate and Glucose Uptakes by Cultured Astrocytes ». *Brain Research* 754(1-2): 65-71.
- Paumier, Adrien et al. 2022. « Astrocyte–Neuron Interplay Is Critical for Alzheimer's Disease Pathogenesis and Is Rescued by TRPA1 Channel Blockade ». *Brain* 145(1): 388-405.
- Pearson, M. A., D. Reczek, A. Bretscher, et P. A. Karplus. 2000. « Structure of the ERM Protein Moesin Reveals the FERM Domain Fold Masked by an Extended Actin Binding Tail Domain ». *Cell* 101(3): 259-70.
- Pham, Emiley et al. 2010. « Progressive Accumulation of Amyloid-Beta Oligomers in Alzheimer's Disease and in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Is Accompanied by Selective Alterations in Synaptic Scaffold Proteins ». *The FEBS journal* 277(14): 3051-67.
- Picascia, Antonietta et al. 2002. « Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Regulates Proliferation and Differentiation of Prostate Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 186(1): 81-87.
- Pickett, Eleanor K. 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(11): 3592-3604.e5.

- de Pins, Benoit, Tiago Mendes, Albert Giralt, et Jean-Antoine Girault. 2021. « The Non-Receptor Tyrosine Kinase Pyk2 in Brain Function and Neurological and Psychiatric Diseases ». *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 13: 749001.
- Planel, Emmanuel et al. 2004. « Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience* 24(10): 2401-11.
- Planel, Emmanuel et al. 2007. « Anesthesia Leads to Tau Hyperphosphorylation through Inhibition of Phosphatase Activity by Hypothermia ». *The Journal of Neuroscience* 27(12): 3090-97.
- Plotkin, Lillian I., Stavros C. Manolagas, et Teresita Bellido. 2007. « Glucocorticoids Induce Osteocyte Apoptosis by Blocking Focal Adhesion Kinase-Mediated Survival. Evidence for inside-out Signaling Leading to Anoikis ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(33): 24120-30.
- Porrero, Cesar, Pablo Rubio-Garrido, Carlos Avendaño, et Francisco Clascá. 2010. « Mapping of Fluorescent Protein-Expressing Neurons and Axon Pathways in Adult and Developing Thy1-eYFP-H Transgenic Mice ». *Brain Research* 1345: 59-72.
- Posritong, Sumana et al. 2018. « Pyk2 Deficiency Potentiates Osteoblast Differentiation and Mineralizing Activity in Response to Estrogen or Raloxifene ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 474: 35-47.
- Posritong, Sumana, Regina Flores Chavez, Tien-Min Gabriel Chu, et Angela Bruzzaniti. 2019. « A Pyk2 Inhibitor Incorporated into a PEGDA-Gelatin Hydrogel Promotes Osteoblast Activity and Mineral Deposition ». *Biomedical Materials (Bristol, England)* 14(2): 025015.
- Postina, Rolf et al. 2004. « A Disintegrin-Metalloproteinase Prevents Amyloid Plaque Formation and Hippocampal Defects in an Alzheimer Disease Mouse Model ». *The Journal of Clinical Investigation* 113(10): 1456-64.
- Preisig, P. A. 2007. « The Acid-Activated Signaling Pathway: Starting with Pyk2 and Ending with Increased NHE3 Activity ». *Kidney International* 72(11): 1324-29.
- Puzzo, Daniela et al. 2008. « Picomolar Amyloid-Beta Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28(53): 14537-45.
- Puzzo, Daniela et al. 2011. « Endogenous Amyloid- $\beta$  Is Necessary for Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory ». *Annals of Neurology* 69(5): 819-30.

- Qi, Haoling et al. 2015. « Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation ». *Biochemistry* 54(7): 1525-33.
- Radde, Rebecca et al. 2006. « A $\beta$ 42-driven Cerebral Amyloidosis in Transgenic Mice Reveals Early and Robust Pathology ». *EMBO reports* 7(9): 940-46.
- Rady, Roseann M., Raymond P. Zinkowski, et Lester I. Binder. 1995. « Presence of Tau in Isolated Nuclei from Human Brain ». *Neurobiology of Aging* 16(3): 479-86.
- Rajendran, Lawrence et al. 2006. « Alzheimer's Disease Beta-Amyloid Peptides Are Released in Association with Exosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(30): 11172-77.
- Ramirez-Rios, Sacnicte et al. 2016. « Tau Antagonizes End-Binding Protein Tracking at Microtubule Ends through a Phosphorylation-Dependent Mechanism ». *Molecular Biology of the Cell* 27(19): 2924-34.
- Reagan, Alaina M. et al. 2022. « Improving Mouse Models for the Study of Alzheimer's Disease ». *Current Topics in Developmental Biology* 148: 79-113.
- Regan, Philip et al. 2015. « Tau Phosphorylation at Serine 396 Residue Is Required for Hippocampal LTD ». *The Journal of Neuroscience* 35(12): 4804-12.
- Reiss, Allison B. et al. 2018. « Amyloid Toxicity in Alzheimer's Disease ». *Reviews in the Neurosciences* 29(6): 613-27.
- Reitz, Christiane, et Richard Mayeux. 2014. « Alzheimer Disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers ». *Biochemical Pharmacology* 88(4): 640-51.
- Renner, Marianne et al. 2010. « Deleterious Effects of Amyloid Beta Oligomers Acting as an Extracellular Scaffold for mGluR5 ». *Neuron* 66(5): 739-54.
- Riedl, Julia et al. 2008. « Lifeact: A Versatile Marker to Visualize F-Actin ». *Nature Methods* 5(7): 605-7.
- Riggs, Daniel, Zhongbo Yang, Jean Kloss, et Joseph C. Loftus. 2011. « The Pyk2 FERM Regulates Pyk2 Complex Formation and Phosphorylation ». *Cellular Signalling* 23(1): 288-96.
- Ripoli, C. et al. 2014. « Intracellular Accumulation of Amyloid- (A ) Protein Plays a Major Role in A -Induced Alterations of Glutamatergic Synaptic Transmission and Plasticity ». *Journal of Neuroscience* 34(38): 12893-903.
- Roberson, Erik D. et al. 2007. « Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid Beta-Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Science (New York, N.Y.)* 316(5825): 750-54.

- Roberson, Erik D. et al. 2011. « Amyloid- $\beta$ /Fyn-Induced Synaptic, Network, and Cognitive Impairments Depend on Tau Levels in Multiple Mouse Models of Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31(2): 700-711.
- Rönicke, Raik et al. 2011. « Early Neuronal Dysfunction by Amyloid  $\beta$  Oligomers Depends on Activation of NR2B-Containing NMDA Receptors ». *Neurobiology of Aging* 32(12): 2219-28.
- Rupp, Niels J. et al. 2011. « Early Onset Amyloid Lesions Lead to Severe Neuritic Abnormalities and Local, but Not Global Neuron Loss in APPPS1 Transgenic Mice ». *Neurobiology of Aging* 32(12): 2324.e1-6.
- Rushworth, Jo V., Heledd H. Griffiths, Nicole T. Watt, et Nigel M. Hooper. 2013. « Prion Protein-Mediated Toxicity of Amyloid- $\beta$  Oligomers Requires Lipid Rafts and the Transmembrane LRP1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(13): 8935-51.
- Russell, Claire L. et al. 2012. « Amyloid- $\beta$  Acts as a Regulator of Neurotransmitter Release Disrupting the Interaction between Synaptophysin and VAMP2 ». *PloS One* 7(8): e43201.
- Sabo, Shasta L., Annat F. Ikin, Joseph D. Buxbaum, et Paul Greengard. 2003. « The Amyloid Precursor Protein and Its Regulatory Protein, FE65, in Growth Cones and Synapses in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23(13): 5407-15.
- Sahu, Surasri Nandan, Stephanie Nunez, Guang Bai, et Anandarup Gupta. 2007. « Interaction of Pyk2 and PTP-PEST with Leupaxin in Prostate Cancer Cells ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292(6): C2288-96.
- Salazar, Santiago V. et al. 2019. « Alzheimer's Disease Risk Factor Pyk2 Mediates Amyloid- $\beta$ -Induced Synaptic Dysfunction and Loss ». *The Journal of Neuroscience* 39(4): 758-72.
- Sancho, Veronica, Bernardo Nuche-Berenguer, et R.T. Jensen. 2012. « The Src Kinase Yes Is Activated in Pancreatic Acinar Cells by Gastrointestinal Hormones/Neurotransmitters, but Not Pancreatic Growth Factors, Which Stimulate Its Association with Numerous Other Signaling Molecules ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823(8): 1285-94.
- Sasaki, Hiroko et al. 1995. « Cloning and Characterization of Cell Adhesion Kinase  $\beta$ , a Novel Protein-Tyrosine Kinase of the Focal Adhesion Kinase Subfamily ». *Journal of Biological Chemistry* 270(36): 21206-19.

- Sayas, C. Laura, Aafke Ariaens, Bas Ponsioen, et Wouter H. Moolenaar. 2006. « GSK-3 Is Activated by the Tyrosine Kinase Pyk2 during LPA<sub>1</sub>-Mediated Neurite Retraction ». *Molecular Biology of the Cell* 17(4): 1834-44.
- Sbrana, Francesca Vittoria et al. 2023. « PYK2 Is Overexpressed in Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Potential New Therapeutic Target ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 27(4): 576-86.
- Schaller, M. D. et al. 1992. « pp125FAK a Structurally Distinctive Protein-Tyrosine Kinase Associated with Focal Adhesions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(11): 5192-96.
- Schallier, Anneleen et al. 2011. « Region- and Age-Specific Changes in Glutamate Transport in the A $\beta$ PP23 Mouse Model for Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 24(2): 287-300.
- Scheff, S. W. et al. 2007. « Synaptic Alterations in CA1 in Mild Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment ». *Neurology* 68(18): 1501-8.
- Scheff, Stephen W. et al. 2015. « Synaptic Change in the Posterior Cingulate Gyrus in the Progression of Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 43(3): 1073-90.
- Schindler, Eva M. et al. 2007. « The Role of Proline-Rich Protein Tyrosine Kinase 2 in Differentiation-Dependent Signaling in Human Epidermal Keratinocytes ». *The Journal of Investigative Dermatology* 127(5): 1094-1106.
- Schipper, Hyman M. 2011. « Apolipoprotein E: Implications for AD Neurobiology, Epidemiology and Risk Assessment ». *Neurobiology of Aging* 32(5): 778-90.
- Schlaepfer, D. D., et T. Hunter. 1996. « Evidence for in Vivo Phosphorylation of the Grb2 SH2-Domain Binding Site on Focal Adhesion Kinase by Src-Family Protein-Tyrosine Kinases ». *Molecular and Cellular Biology* 16(10): 5623-33.
- Schneider, A. et al. 1999. « Phosphorylation That Detaches Tau Protein from Microtubules (Ser262, Ser214) Also Protects It against Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments ». *Biochemistry* 38(12): 3549-58.
- Schwartzentruber, Jeremy et al. 2021. « Genome-Wide Meta-Analysis, Fine-Mapping and Integrative Prioritization Implicate New Alzheimer's Disease Risk Genes ». *Nature Genetics* 53(3): 392-402.
- Schweers, O., E. Schönbrunn-Hanebeck, A. Marx, et E. Mandelkow. 1994. « Structural Studies of Tau Protein and Alzheimer Paired Helical Filaments Show No Evidence for Beta-Structure ». *The Journal of Biological Chemistry* 269(39): 24290-97.

- Seabold, Gail K. et al. 2003. « Interaction of the Tyrosine Kinase Pyk2 with the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Complex via the Src Homology 3 Domains of PSD-95 and SAP102 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(17): 15040-48.
- Seidler, P. M. et al. 2018. « Structure-Based Inhibitors of Tau Aggregation ». *Nature Chemistry* 10(2): 170-76.
- Selkoe, D. J. 1991. « The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 6(4): 487-98.
- Selkoe, Dennis J. 2011. « Alzheimer's Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(7): a004457.
- Sengupta, A. et al. 1998. « Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357(2): 299-309.
- Serenó, L. et al. 2009. « A Novel GSK-3 $\beta$  Inhibitor Reduces Alzheimer's Pathology and Rescues Neuronal Loss in Vivo ». *Neurobiology of Disease* 35(3): 359-67.
- Serneels, Lutgarde et al. 2009. « Gamma-Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 324(5927): 639-42.
- Sgourakis, Nikolaos G. et al. 2007. « The Alzheimer's Peptides A $\beta$ 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD / NMR Study ». *Journal of Molecular Biology* 368(5): 1448-57.
- Shankar, Ganesh M. et al. 2007. « Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- $\beta$  Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway ». *The Journal of Neuroscience* 27(11): 2866-75.
- Shankar, Ganesh M. et al. 2008. « Amyloid-Beta Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory ». *Nature Medicine* 14(8): 837-42.
- Shen, Ting, et Qiang Guo. 2018. « Role of Pyk2 in Human Cancers ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 24: 8172-82.
- Shen, Y., et M. D. Schaller. 1999. « Focal Adhesion Targeting: The Critical Determinant of FAK Regulation and Substrate Phosphorylation ». *Molecular Biology of the Cell* 10(8): 2507-18.
- Shipton, Olivia A. et al. 2011. « Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31(5): 1688-92.

- Siano, Giacomo et al. 2019. « Tau Modulates VGlut1 Expression ». *Journal of Molecular Biology* 431(4): 873-84.
- Siciliano, Julio C. et al. 1996. « Differential Regulation of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2/Cell Adhesion Kinase  $\beta$  (PYK2/CAK $\beta$ ) and pp125FAK by Glutamate and Depolarization in Rat Hippocampus ». *Journal of Biological Chemistry* 271(46): 28942-46.
- Sieg, D. J. et al. 1998. « Pyk2 and Src-Family Protein-Tyrosine Kinases Compensate for the Loss of FAK in Fibronectin-Stimulated Signaling Events but Pyk2 Does Not Fully Function to Enhance FAK- Cell Migration ». *The EMBO journal* 17(20): 5933-47.
- Sluimer, J. D. et al. 2008. « Whole-Brain Atrophy Rate in Alzheimer Disease: Identifying Fast Progressors ». *Neurology* 70(Issue 19, Part 2): 1836-41.
- Small, Scott A., et Karen Duff. 2008. « Linking Abeta and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis ». *Neuron* 60(4): 534-42.
- Snyder, Eric M. et al. 2005. « Regulation of NMDA Receptor Trafficking by Amyloid-Beta ». *Nature Neuroscience* 8(8): 1051-58.
- Soe, Nwe Nwe et al. 2009. « Nifedipine Interferes with Migration of Vascular Smooth Muscle Cells via Inhibition of Pyk2-Src Axis ». *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 16(3): 230-38.
- Soni, Dheeraj et al. 2017. « Pyk2 Phosphorylation of VE-PTP Downstream of STIM1-Induced Ca<sup>2+</sup> Entry Regulates Disassembly of Adherens Junctions ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 312(6): L1003-17.
- Sosa, Lucas J. et al. 2013. « Amyloid Precursor Protein Is an Autonomous Growth Cone Adhesion Molecule Engaged in Contact Guidance ». *PLoS One* 8(5): e64521.
- Souchet, B. et al. 2022. « Cerebral Phospho-Tau Acts Synergistically with Soluble A $\beta$ 42 Leading to Mild Cognitive Impairment in AAV-AD Rats ». *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 9(3): 480-90.
- Sperling, Reisa A. et al. 2009. « Amyloid Deposition Is Associated with Impaired Default Network Function in Older Persons without Dementia ». *Neuron* 63(2): 178-88.
- Sperling, Reisa A. et al. 2011. « Toward Defining the Preclinical Stages of Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 7(3): 280-92.
- Sperling, Reisa, Elizabeth Mormino, et Keith Johnson. 2014. « The Evolution of Preclinical Alzheimer's Disease: Implications for Prevention Trials ». *Neuron* 84(3): 608-22.

- Spires-Jones, Tara L. et al. 2011. « Are Tangles as Toxic as They Look? » *Journal of Molecular Neuroscience* 45(3): 438-44.
- Stamer, K. et al. 2002. « Tau Blocks Traffic of Organelles, Neurofilaments, and APP Vesicles in Neurons and Enhances Oxidative Stress ». *The Journal of Cell Biology* 156(6): 1051-63.
- Steiner, B. et al. 1990. « Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: Identification of the Site for Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Dependent Kinase and Relationship with Tau Phosphorylation in Alzheimer Tangles ». *The EMBO journal* 9(11): 3539-44.
- Stern, Jamie L. et al. 2017. « Phosphoregulation of Tau Modulates Inhibition of Kinesin-1 Motility » éd. David G. Drubin. *Molecular Biology of the Cell* 28(8): 1079-87.
- Strang, Kevin H. et al. 2019. « Phosphorylation of Serine 305 in Tau Inhibits Aggregation ». *Neuroscience Letters* 692: 187-92.
- Strittmatter, W J et al. 1993. « Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to Beta-Amyloid and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(5): 1977-81.
- Sultan, Audrey et al. 2011. « Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(6): 4566-75.
- Suo, Lun et al. 2012. « Protocadherin Clusters and Cell Adhesion Kinase Regulate Dendrite Complexity through Rho GTPase ». *Journal of Molecular Cell Biology* 4(6): 362-76.
- Swatton, Jane E. et al. 2004. « Increased MAP Kinase Activity in Alzheimer's and Down Syndrome but Not in Schizophrenia Human Brain ». *The European Journal of Neuroscience* 19(10): 2711-19.
- Szodorai, Anita et al. 2009. « APP Anterograde Transport Requires Rab3A GTPase Activity for Assembly of the Transport Vesicle ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29(46): 14534-44.
- Taddei, Raquel N. et al. 2023. « Tau Oligomer-Containing Synapse Elimination by Microglia and Astrocytes in Alzheimer Disease ». *JAMA Neurology*. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/2809939> (23 octobre 2023).
- Tai, Hwan-Ching et al. 2012. « The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System ». *The American Journal of Pathology* 181(4): 1426-35.
- Takahashi, Reisuke H. et al. 2010. « Co-Occurrence of Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid and  $\tau$  Pathologies at Synapses ». *Neurobiology of Aging* 31(7): 1145-52.

- Talantova, Maria et al. 2013. « A $\beta$  Induces Astrocytic Glutamate Release, Extrasynaptic NMDA Receptor Activation, and Synaptic Loss ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27): E2518-2527.
- Tampellini, Davide et al. 2011. « Impaired  $\beta$ -Amyloid Secretion in Alzheimer's Disease Pathogenesis ». *The Journal of Neuroscience* 31(43): 15384-90.
- Tang, Hua, Zhizhuang Joe Zhao, Erwin J. Landon, et Tadashi Inagami. 2000. « Regulation of Calcium-Sensitive Tyrosine Kinase Pyk2 by Angiotensin II in Endothelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 275(12): 8389-96.
- Tashiro, K., M. Hasegawa, Y. Ihara, et T. Iwatsubo. 1997. « Somatodendritic Localization of Phosphorylated Tau in Neonatal and Adult Rat Cerebral Cortex ». *Neuroreport* 8(12): 2797-2801.
- Terry, Robert D. et al. 1991. « Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment ». *Annals of Neurology* 30(4): 572-80.
- Terunuma, Miho et al. 2010. « Prolonged Activation of NMDA Receptors Promotes Dephosphorylation and Alters Postendocytic Sorting of GABAB Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(31): 13918-23.
- Thomas, Jeffrey W. et al. 1998. « SH2- and SH3-Mediated Interactions between Focal Adhesion Kinase and Src ». *Journal of Biological Chemistry* 273(1): 577-83.
- Tian, D., V. Litvak, et S. Lev. 2000. « Cerebral Ischemia and Seizures Induce Tyrosine Phosphorylation of PYK2 in Neurons and Microglial Cells ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20(17): 6478-87.
- Tokiwa, G., I. Dikic, S. Lev, et J. Schlessinger. 1996. « Activation of Pyk2 by Stress Signals and Coupling with JNK Signaling Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 273(5276): 792-94.
- Tomé, Sandra O. et al. 2021. « TDP-43 Interacts with Pathological  $\tau$  Protein in Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 141(5): 795-99.
- Tomiyama, Takami et al. 2008. « A New Amyloid Beta Variant Favoring Oligomerization in Alzheimer's-Type Dementia ». *Annals of Neurology* 63(3): 377-87.
- Tomiyama, Takami et al. 2010. « A Mouse Model of Amyloid  $\beta$  Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss *In Vivo* ». *The Journal of Neuroscience* 30(14): 4845-56.

- Tomiyama, Takami, et Hiroyuki Shimada. 2020. « APP Osaka Mutation in Familial Alzheimer's Disease-Its Discovery, Phenotypes, and Mechanism of Recessive Inheritance ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1413.
- Trojanowski, J. Q., T. Schuck, M. L. Schmidt, et V. M. Lee. 1989. « Distribution of Tau Proteins in the Normal Human Central and Peripheral Nervous System ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 37(2): 209-15.
- Tse, Kathy W. K. et al. 2012. « Small Molecule Inhibitors of the Pyk2 and FAK Kinases Modulate Chemoattractant-Induced Migration, Adhesion and Akt Activation in Follicular and Marginal Zone B Cells ». *Cellular Immunology* 275(1-2): 47-54.
- Tu, Shichun, Shu-ichi Okamoto, Stuart A. Lipton, et Huaxi Xu. 2014. « Oligomeric A $\beta$ -Induced Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurodegeneration* 9: 48.
- Twafra, Shams et al. 2023. « A Novel Pyk2-Derived Peptide Inhibits Invadopodia-Mediated Breast Cancer Metastasis ». *Oncogene* 42(4): 278-92.
- Ulrich, Daniel. 2015. « Amyloid- $\beta$  Impairs Synaptic Inhibition via GABA(A) Receptor Endocytosis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35(24): 9205-10.
- Um, Ji Won et al. 2012. « Alzheimer Amyloid- $\beta$  Oligomer Bound to Postsynaptic Prion Protein Activates Fyn to Impair Neurons ». *Nature Neuroscience* 15(9): 1227-35.
- Utton, Michelle A. et al. 2005. « Molecular Motors Implicated in the Axonal Transport of Tau and Alpha-Synuclein ». *Journal of Cell Science* 118(Pt 20): 4645-54.
- Uzoma, Ijeoma et al. 2018. « Global Identification of Small Ubiquitin-Related Modifier (SUMO) Substrates Reveals Crosstalk between SUMOylation and Phosphorylation Promotes Cell Migration ». *Molecular & Cellular Proteomics* 17(5): 871-88.
- Välimäki, Elina et al. 2013. « Monosodium Urate Activates Src/Pyk2/PI3 Kinase and Cathepsin Dependent Unconventional Protein Secretion from Human Primary Macrophages ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 12(3): 749-63.
- Vanarotti, Murugendra S. et al. 2014. « Structural and Mechanistic Insights into the Interaction between Pyk2 and Paxillin LD Motifs ». *Journal of Molecular Biology* 426(24): 3985-4001.
- Vanarotti, Murugendra S. et al. 2016. « Structural Basis for the Interaction between Pyk2-FAT Domain and Leupaxin LD Repeats ». *Biochemistry* 55(9): 1332-45.
- Varga, Edina et al. 2014. « Abeta(1-42) Enhances Neuronal Excitability in the CA1 via NR2B Subunit-Containing NMDA Receptors ». *Neural Plasticity* 2014: 584314.

- Vega, Irving E. et al. 2005. « Increase in Tau Tyrosine Phosphorylation Correlates with the Formation of Tau Aggregates ». *Molecular Brain Research* 138(2): 135-44.
- Velazquez, Ramon et al. 2018. « Acute Tau Knockdown in the Hippocampus of Adult Mice Causes Learning and Memory Deficits ». *Aging Cell* 17(4): e12775.
- Venkitaramani, Deepa V., Paula J. Moura, Marina R. Picciotto, et Paul J. Lombroso. 2011. « Striatal-enriched Protein Tyrosine Phosphatase (STEP) Knockout Mice Have Enhanced Hippocampal Memory ». *European Journal of Neuroscience* 33(12): 2288-98.
- Verret, Laure et al. 2012. « Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model ». *Cell* 149(3): 708-21.
- Vershinin, Michael et al. 2007. « Multiple-Motor Based Transport and Its Regulation by Tau ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(1): 87-92.
- Violet, Marie et al. 2014. « A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00084/abstract> (5 octobre 2023).
- Violet, Marie et al. 2015. « Prefibrillar Tau Oligomers Alter the Nucleic Acid Protective Function of Tau in Hippocampal Neurons in Vivo ». *Neurobiology of Disease* 82: 540-51.
- Von Bergen, M. et al. 2000. « Assembly of  $\tau$  Protein into Alzheimer Paired Helical Filaments Depends on a Local Sequence Motif ( <sup>306</sup> VQIVYK <sup>311</sup> ) Forming  $\beta$  Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(10): 5129-34.
- Vossel, Keith A. et al. 2010. « Tau Reduction Prevents Abeta-Induced Defects in Axonal Transport ». *Science (New York, N.Y.)* 330(6001): 198.
- Walsh, Dominic M. et al. 2002. « Naturally Secreted Oligomers of Amyloid  $\beta$  Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo ». *Nature* 416(6880): 535-39.
- Walsh, Dominic M., et Dennis J. Selkoe. 2007. « A? Oligomers ? A Decade of Discovery ». *Journal of Neurochemistry* 101(5): 1172-84.
- Wang, Dayong et al. 2013. « B2 Adrenergic Receptor, Protein Kinase A (PKA) and c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Signaling Pathways Mediate Tau Pathology in Alzheimer Disease Models ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(15): 10298-307.
- Wang, Hoau-Yan et al. 2000. «  $\beta$ -Amyloid1-42 Binds to A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity ». *Journal of Biological Chemistry* 275(8): 5626-32.

- Wang, Hong, et Georg Reiser. 2003. « The Role of the Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Tyrosine Kinase Pyk2 and Src in Thrombin Signalling in Rat Astrocytes ». *Journal of Neurochemistry* 84(6): 1349-57.
- Wang, J., D. W. Dickson, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee. 1999. « The Levels of Soluble versus Insoluble Brain Abeta Distinguish Alzheimer's Disease from Normal and Pathologic Aging ». *Experimental Neurology* 158(2): 328-37.
- Wang, Jian-Zhi, Inge Grundke-Iqbal, et Khalid Iqbal. 2007. « Kinases and Phosphatases and Tau Sites Involved in Alzheimer Neurofibrillary Degeneration: Kinase/Phosphatase/Sites Involved in Tau Pathology ». *European Journal of Neuroscience* 25(1): 59-68.
- Wang, Qiang et al. 2003. « Regulation of the Formation of Osteoclastic Actin Rings by Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Interacting with Gelsolin ». *The Journal of Cell Biology* 160(4): 565-75.
- Wang, Xingbin et al. 2015. « Genetic Determinants of Survival in Patients with Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 45(2): 651-58.
- Wang, Yipeng, Sarika Garg, Eva-Maria Mandelkow, et Eckhard Mandelkow. 2010. « Proteolytic Processing of Tau ». *Biochemical Society Transactions* 38(4): 955-61.
- Wang, Yipeng, et Eckhard Mandelkow. 2016. « Tau in Physiology and Pathology ». *Nature Reviews. Neuroscience* 17(1): 5-21.
- Watson, J. M. et al. 2001. « Inhibition of the Calcium-Dependent Tyrosine Kinase (CADTK) Blocks Monocyte Spreading and Motility ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(5): 3536-42.
- Wei, Lin, Yu Yang, Xin Zhang, et Qiang Yu. 2004. « Altered Regulation of Src upon Cell Detachment Protects Human Lung Adenocarcinoma Cells from Anoikis ». *Oncogene* 23(56): 9052-61.
- Wei, Wei et al. 2010. « Amyloid Beta from Axons and Dendrites Reduces Local Spine Number and Plasticity ». *Nature Neuroscience* 13(2): 190-96.
- Wei, Yan et al. 2008. « Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA from Damage by Peroxidation ». *PLoS One* 3(7): e2600.
- Weingarten, M D, A H Lockwood, S Y Hwo, et M W Kirschner. 1975. « A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(5): 1858-62.
- Whitwell, Jennifer L. et al. 2015. « Working Memory and Language Network Dysfunctions in Logopenic Aphasia: A Task-Free fMRI Comparison with Alzheimer's Dementia ». *Neurobiology of Aging* 36(3): 1245-52.

- Whyte, Alonzo J. et al. 2021. « Cell Adhesion Factors in the Orbitofrontal Cortex Control Cue-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking and Amygdala-Dependent Goal Seeking ». *The Journal of Neuroscience* 41(27): 5923-36.
- Williams, Michael R., Jonathan C. Markey, Megan A. Doczi, et Anthony D. Morielli. 2007. « An Essential Role for Cortactin in the Modulation of the Potassium Channel Kv1.2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(44): 17412-17.
- Wirhth, O. et al. 2001. « Intraneuronal Abeta Accumulation Precedes Plaque Formation in Beta-Amyloid Precursor Protein and Presenilin-1 Double-Transgenic Mice ». *Neuroscience Letters* 306(1-2): 116-20.
- Wirhth, Oliver, et Silvia Zampar. 2020. « Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(21): 8144.
- Wischik, C M et al. 1988. « Isolation of a Fragment of Tau Derived from the Core of the Paired Helical Filament of Alzheimer Disease. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(12): 4506-10.
- Xia, Weiliang, Yan Shen, Haiyang Xie, et Shusen Zheng. 2006. « Involvement of Endoplasmic Reticulum in Hepatitis B Virus Replication ». *Virus Research* 121(2): 116-21.
- Xie, Jianjun et al. 2008. « Analysis of the Calcium-Dependent Regulation of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 by Gonadotropin-Releasing Hormone ». *Molecular Endocrinology* 22(10): 2322-35.
- Xiong, W. C., M. Macklem, et J. T. Parsons. 1998. « Expression and Characterization of Splice Variants of PYK2, a Focal Adhesion Kinase-Related Protein ». *Journal of Cell Science* 111 ( Pt 14): 1981-91.
- Xiong, W., et J. T. Parsons. 1997. « Induction of Apoptosis after Expression of PYK2, a Tyrosine Kinase Structurally Related to Focal Adhesion Kinase ». *The Journal of Cell Biology* 139(2): 529-39.
- Xu, Jian et al. 2012. « Striatal-Enriched Protein-Tyrosine Phosphatase (STEP) Regulates Pyk2 Kinase Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(25): 20942-56.
- Xu, Jian et al. 2014. « Inhibitor of the Tyrosine Phosphatase STEP Reverses Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease » éd. Chaitan Khosla. *PLoS Biology* 12(8): e1001923.
- Yadav, Neera et al. 2023. « Tyrphostin A9 Attenuates Glioblastoma Growth by Suppressing PYK2/EGFR-ERK Signaling Pathway ». *Journal of Neuro-Oncology* 163(3): 675-92.

- Yamamoto, Kaoru et al. 2015. « Chronic Optogenetic Activation Augments A $\beta$  Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease ». *Cell Reports* 11(6): 859-65.
- Yamamoto, Shinichiro et al. 2008. « TRPM2-Mediated Ca<sup>2+</sup> Influx Induces Chemokine Production in Monocytes That Aggravates Inflammatory Neutrophil Infiltration ». *Nature Medicine* 14(7): 738-47.
- Yamasaki, Masahide et al. 2001. « Monocyte Chemoattractant Protein 1 Causes Differential Signalling Mediated by Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in THP-1 Cells ». *Biochemical Journal* 355(3): 751-56.
- Yamazaki, Tsuneo, Edward H. Koo, et Dennis J. Selkoe. 1997. « Cell Surface Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor Colocalizes with B1 Integrins at Substrate Contact Sites in Neural Cells ». *The Journal of Neuroscience* 17(3): 1004-10.
- Yamazaki, Yu et al. 2019. « Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Pathobiology and Targeting Strategies ». *Nature Reviews Neurology* 15(9): 501-18.
- Yan, Xian-Liang et al. 2015. « S-Nitrosylation of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Involves Its Activation Induced by Oxygen-Glucose Deprivation ». *Neuroscience Letters* 597: 90-96.
- Yang, Li et al. 2009. « Amyloid Precursor Protein Regulates Cav1.2 L-Type Calcium Channel Levels and Function to Influence GABAergic Short-Term Plasticity ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29(50): 15660-68.
- Yasojima, K. et al. 2000. « Casein Kinase 1 Delta mRNA Is Upregulated in Alzheimer Disease Brain ». *Brain Research* 865(1): 116-20.
- You, Kai, Yi Huang, Ming-Can Zhang, et Jia Hao. 2015. « Control and Prevention of Myocardial Fibrosis Using Pyk2-Related Non-Kinase ». *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8(10): 18284-92.
- Yu, H. et al. 1996. « Activation of a Novel Calcium-Dependent Protein-Tyrosine Kinase. Correlation with c-Jun N-Terminal Kinase but Not Mitogen-Activated Protein Kinase Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 271(47): 29993-98.
- Yu, Yang et al. 2009. « Developmental Regulation of Tau Phosphorylation, Tau Kinases, and Tau Phosphatases ». *Journal of Neurochemistry* 108(6): 1480-94.
- Yuan, Aidong et al. 2008. « Axonal Transport Rates *In Vivo* Are Unaffected by Tau Deletion or Overexpression in Mice ». *The Journal of Neuroscience* 28(7): 1682-87.
- Yue, Yang et al. 2015. « The Role of Pyk2 in the CCR7-Mediated Regulation of Metastasis and Viability in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Cells *In Vivo* and *In Vitro* ». *Oncology Reports* 34(6): 3280-87.

- Zabik, Nicole L., Matthew M. Imhof, et Sanela Martic-Milne. 2017. « Structural Evaluations of Tau Protein Conformation: Methodologies and Approaches ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 95(3): 338-49.
- Zempel, Hans et al. 2013. « Amyloid- $\beta$  Oligomers Induce Synaptic Damage via Tau-Dependent Microtubule Severing by TLL6 and Spastin ». *The EMBO journal* 32(22): 2920-37.
- Zempel, Hans, et Eva-Maria Mandelkow. 2015. « Tau Missorting and Spastin-Induced Microtubule Disruption in Neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia ». *Molecular Neurodegeneration* 10: 68.
- Zhang, Bin et al. 2012. « The Microtubule-Stabilizing Agent, Epothilone D, Reduces Axonal Dysfunction, Neurotoxicity, Cognitive Deficits, and Alzheimer-like Pathology in an Interventional Study with Aged Tau Transgenic Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32(11): 3601-11.
- Zhang, Yan, Peiyao Li, Jianbo Feng, et Minghua Wu. 2016. « Dysfunction of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease ». *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 37(7): 1039-47.
- Zhang, Yongfang et al. 2010. « Genetic Reduction of Striatal-Enriched Tyrosine Phosphatase (STEP) Reverses Cognitive and Cellular Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(44): 19014-19.
- Zhang, Yongfang et al. 2024. « E674Q (Shanghai APP Mutant), a Novel Amyloid Precursor Protein Mutation, in Familial Late-Onset Alzheimer's Disease ». *Genes & Diseases* 11(2): 1022-34.
- Zhang, Zhentao et al. 2014. « Cleavage of Tau by Asparagine Endopeptidase Mediates the Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease ». *Nature Medicine* 20(11): 1254-62.
- Zhao, Chao et al. 2015. « The Upregulation of NR2A-Containing N-Methyl-d-Aspartate Receptor Function by Tyrosine Phosphorylation of Postsynaptic Density 95 Via Facilitating Src/Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Activation ». *Molecular Neurobiology* 51(2): 500-511.
- Zhao, Ming, Darren Finlay, Irina Zharkikh, et Kristiina Vuori. 2016. « Novel Role of Src in Priming Pyk2 Phosphorylation » éd. Laszlo Buday. *PLOS ONE* 11(2): e0149231.
- Zhao, Tieming, et Gary M. Bokoch. 2005. « Critical Role of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in Reversion of the Adhesion-Mediated Suppression of Reactive Oxygen Species Generation by Human Neutrophils ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174(12): 8049-55.

- Zhao, Wei-Qin et al. 2010. « Inhibition of Calcineurin-Mediated Endocytosis and Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors Prevents Amyloid Beta Oligomer-Induced Synaptic Disruption ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7619-32.
- Zheng, Jin et al. 2022. « Pyk2 Suppresses Contextual Fear Memory in an Autophosphorylation-Independent Manner ». *Journal of Molecular Cell Biology* 13(11): 808-21.
- Zhu, Xiangdong et al. 2008. « Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Regulates Spreading and Migration of Eosinophils after Beta2-Integrin Adhesion ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 39(3): 263-69.
- Zhu, Xiangdong, Yonghua Bao, Yongchen Guo, et Wancai Yang. 2018. « Proline-Rich Protein Tyrosine Kinase 2 in Inflammation and Cancer ». *Cancers* 10(5): 139.
- Zilka, Norbert et al. 2006. « Truncated Tau from Sporadic Alzheimer's Disease Suffices to Drive Neurofibrillary Degeneration in Vivo ». *FEBS Letters* 580(15): 3582-88.
- Zott, Benedikt et al. 2019. « A Vicious Cycle of  $\beta$  Amyloid-Dependent Neuronal Hyperactivation ». *Science (New York, N.Y.)* 365(6453): 559-65.
- Zwick, Esther, Christian Wallasch, Henrik Daub, et Axel Ullrich. 1999. « Distinct Calcium-Dependent Pathways of Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and PYK2 Tyrosine Phosphorylation in PC12 Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 274(30): 20989-96.



**Résumé :** La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative et la forme la plus fréquente de démence. Elle se caractérise neuropathologiquement par une accumulation extracellulaire de peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) formant des plaques séniles et par l'agrégation de protéines Tau anormalement hyperphosphorylée correspondant à des dégénérescences neurofibrillaires. Au niveau de l'activité cérébrale, une hyperactivité précoce de l'hippocampe est observée qui va ensuite laisser place à une hypoactivité aux stades plus tardifs de la maladie. Bien que la plupart des formes de la maladie soient sporadiques, il existe une forte prédisposition génétique. En 2013, une étude génomique a identifié *PTK2B* comme un nouveau facteur de risque associé à la MA. Ce gène code pour la protéine Pyk2, une tyrosine kinase jouant un rôle dans la plasticité synaptique. De nombreuses études ont validé l'implication de Pyk2 dans la physiopathologie de la MA mais son rôle exact fait toujours l'objet de débats du fait de résultats contradictoires. Dans cette étude, nous avons montré que les oligomères d' $A\beta$  induisent une activation de Pyk2 au niveau synaptique. De plus, Pyk2 semble impliquée dans l'hyperactivité neuronale de l'hippocampe. Nous avons également mis en évidence qu'une surexpression de Pyk2 dans des neurones corticaux en culture entraîne une diminution de la densité synaptique indépendamment de son activation ou de son activité kinase. Cette altération de la densité synaptique semble davantage liée au domaine riche en proline 1 de Pyk2, potentiellement impliqué dans des interactions protéine-protéine. Parmi les protéines pouvant interagir avec Pyk2, on trouve la protéine Tau qui a précédemment été montrée comme un substrat potentiel de Pyk2. Nous avons ainsi montré que Pyk2 induit la localisation et la phosphorylation de Tau dans le compartiment post-synaptique. En résumé, ce travail de thèse suggère une implication de Pyk2 à l'interface des pathologies amyloïde et Tau. Pyk2 participerait également aux altérations de la neurotransmission synaptique observées dans les phases précoces de la MA, ouvrant ainsi la voie pour l'application de thérapeutiques ciblant Pyk2 dans les premières phases de la maladie.

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common form of dementia. Neuropathologically, it is characterized by extracellular accumulation of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ), forming senile plaques, and aggregation of abnormally hyperphosphorylated Tau proteins, corresponding to neurofibrillary tangles. In terms of brain activity, an early hyperactivity of the hippocampus is observed, which then leads to hypoactivity in the later stages of the disease. Although most forms of the disease are sporadic, there is a strong genetic predisposition. In 2013, a genomic study identified *PTK2B* as a new risk factor associated with AD. This gene codes for Pyk2, a tyrosine kinase involved in synaptic plasticity. Numerous studies have validated the involvement of Pyk2 in the pathophysiology of AD, but its exact role is still debated due to conflicting results. In this study, we have shown that  $A\beta$  oligomers induce Pyk2 activation in synapses. Moreover, Pyk2 appears to be involved in neuronal hyperactivity in the hippocampus. We have also shown that overexpression of Pyk2 in cultured cortical neurons leads to a decrease in synaptic density independently of its activation or its kinase activity. This alteration in synaptic density seems to be more closely linked to Pyk2's proline-rich domain 1, potentially involved in protein-protein interactions. Among the proteins that can interact with Pyk2 is Tau, previously shown to be a potential substrate for Pyk2. We have shown that Pyk2 induces the localization and phosphorylation of Tau in the postsynaptic compartment. In summary, this thesis suggests Pyk2 involvement at the interface of amyloid and Tau pathologies. Pyk2 would also be involved in the alterations in synaptic neurotransmission observed in the early phases of AD, paving the way for the application of therapeutics targeting Pyk2 in the early stages of the disease.