



Lille
Neuroscience
& Cognition



Inserm



Université
de Lille

Ecole Doctorale Biologie - Santé de Lille (ED446)

Thèse de doctorat de l'Université de Lille

Présentée par

Marie TAUTOU

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité Neurosciences

Etude *in vivo* et mode d'action de molécules de structure polyamino biarylique sur les processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer

Université de Lille, Laboratoire INSERM - Equipe Alzheimer et Tauopathies du Dr. Luc BUÉE

Thèse dirigée par Mme le **Pr. Patricia MELNYK** et M. le **Dr. Nicolas SERGEANT**

Soutenue publiquement le **29 octobre 2021**, devant le jury composé de :

Mme Sylvie CLAEYSEN , Chargée de Recherche, HDR – IGF, Montpellier	Rapporteure
Mme Anne-Laurence BOUTILLIER , Directrice de Recherche – LNCA, Strasbourg	Rapporteure
M. Santiago RIVERA , Directeur de Recherche – INP, Marseille	Examineur
M. Pascal KIENLEN-CAMPARD , Professeur ordinaire – UCLouvain, Bruxelles	Examineur, Président du jury
Mme Patricia MELNYK , Professeure – LilNCog, Lille	Co-directrice de thèse
M. Nicolas SERGEANT , Directeur de Recherche – LilNCog, Lille	Co-directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury le Dr. Sylvie Claeysen, le Dr. Anne-Laurence Boutillier, le Dr. Santiago Rivera et le Dr. Pascal Kielen-Campard d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tout d'abord le Dr. **Luc Buée**, directeur de l'équipe « Alzheimer et Tauopathies », pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer ma thèse dans votre laboratoire. Je tiens à vous remercier également pour m'avoir permis de continuer les traitements de mes souris pendant le confinement, et pour vos critiques qui ont contribué à me pousser vers le haut.

Je voudrais remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, le Dr. **Nicolas Sergeant** et le Pr. **Patricia Melnyk**. Merci pour votre confiance et pour m'avoir choisie comme candidate sur ce sujet si intéressant malgré le fait que vous ne me connaissiez que peu. Nicolas, merci pour ces discussions scientifiques si enrichissantes qui ont contribué à ma réalisation en tant que jeune chercheuse. Je te remercie aussi de m'avoir laissée si autonome dans mon travail et à la réalisation de mes expériences, de m'avoir laissée prendre des initiatives. Patricia, merci pour ton implication tout au long de mon parcours de thèse et pour avoir pris le temps de me mettre à niveau en chimie des molécules, j'ai beaucoup appris grâce à toi. Merci pour votre aide au quotidien et vos conseils.

Je tiens à remercier les Dr. **Morvane Colin**, **Valérie Buée-Scherrer**, **Bruno Lefevre**, **Malika Hamdane**, **Bernard Sablionnière**, **Vincent Huin** et **Marie-Christine Galas** pour vos remarques constructives en réunion de labo. Un merci tout particulier au Dr. **David Blum** pour vos conseils bienveillants sur la partie in vivo de mon projet et vos remarques pertinentes sur le manuscrit de mon premier article.

J'aimerais adresser un grand merci aux ITA de l'équipe : **Raphaëlle Caillierez** pour tes précieux conseils en histo, **Sébastien Carrier** pour ton aide avec les plasmides et le génotypage. Evidemment un merci tout particulier à **Sabiha Eddarkaoui**, sans qui j'aurais été si perdue dans les manips au départ, merci pour ton aide technique (notre Google locale !) mais également pour m'avoir écoutée et rassurée un certain nombre de fois, tu auras rendu ma thèse bien plus facile.

Un grand merci à **Mathilde Coevoet**, qui aura été mon mentor technique et qui m'aura permis de prendre mes repères à mon arrivée. Ta bonne humeur et ta patience ont été énormément appréciées. J'ai adoré nos sorties au resto et nos potins, tu seras devenue plus qu'une collègue finalement.

Un merci du fond du cœur à la plus supportable des Parisiennes, ma **Chloé Lamarre** adorée. Tu m'as si souvent aidée et soutenue, aussi bien scientifiquement que moralement que je n'ai plus le compte. Qui aurait pensé que dans ce labo je trouverais non seulement une personne intéressée par toutes mes péripéties, mais également une oreille attentive pour me plaindre, une partenaire de voyages, un insupportable jukebox, une meilleure amie en somme. Même si tu as osé lâchement partir avant moi, merci pour tout, tu le sais, tu es la meilleure.

Merci à mes fidèles compagnons d'aventure **Elodie Leroux**, **Marine Dénéchaud** et **Thomas Rico**. Merci car sans vous ma thèse aurait été plus morose. Nous avons commencé ensemble, il s'est passé milles choses inattendues et nous avons tous tenu le coup. Merci à Elodie, pour ces soirées au Uno's, nos bières dans les parcs, pour ta bonne humeur contagieuse et ton sens de la fête. Merci à Marine, pour ta gentillesse et ton rire communicatif, toutes nos soirées mais également pour ton soutien à travers toutes nos conversations, ça m'a beaucoup aidé. Et également merci à Thomas, pour nos discussions enflammées sur la science et à peu près tous les sujets du monde. Merci de m'avoir écouté me plaindre chaque jour entre deux manips sur toutes celles qui ne marchaient pas. J'ai dû perdre environ deux mois de ma thèse à discuter avec toi, mais j'en ai regagné autant avec tes bonnes idées pour mes manips. Je pense que tu seras d'accord pour dire que notre présence respective aura rendu nos thèses plus divertissantes.

Merci à tous mes collègues si sympas : **Sarah Guedjal**, sûrement la personne la plus gentille que j'ai pu rencontrer, et **Florian Vermon**, avec qui j'ai adoré travailler. **Théo Boschetti** pour les pires blagues graveleuses que j'ai entendues, mais aussi les meilleures. Merci à **Thomas Comptdaer**, pour son aide technique dans le labo et nos conversations intéressantes le midi. Merci au jeune Dr. **Kevin Carvalho**, à qui je dois pas mal d'astuces pour mes manips, en plus de beaucoup de jolies photos (dont certaines volées hein, paparazzi). Merci pour ton aide et tes bons conseils, tes bonnes idées m'auront permis de débloquer pas mal de situations. Merci à **Emilie Faivre** pour ses conseils avisés et son aide précieuse sur mes manips, tu es un pilier de ce labo. Merci à **Sarah Leclerc** pour ta bienveillance et à **Sarra**

Kraiem, mon petit rayon de soleil du Sud qui m'a aidée à traverser pleins de moments difficiles, tu es au top et j'ai de la chance de t'avoir comme amie. Tous nos bavardages vont me manquer.

Merci à l'équipe BBC, et en particulier à **Florian Descamps**, **Paul-Emmanuel Larchanché** pour la synthèse des molécules nécessaires à mon étude et **Jamal El Bakali** pour ma préparation pour le concours de l'école doctorale.

Un merci spécial à **Antonino Bongiovanni**, qui m'a beaucoup aidée dans la mise en place de mes macros de quantification. Merci pour ta patience face à ma nullité en codage, j'ai gagné un temps infini grâce à toi.

Merci également à toute l'équipe du secrétariat **Céline Brand**, **Sophie Lesage** et **Nathalie Perrais** pour votre gentillesse et votre sollicitude à mon égard chaque jour, vous m'avez beaucoup aidée. Merci à **Thomas et Karim** de la laverie de nous simplifier la vie.

Enfin je remercie ceux qui me sont chers, ma famille. Merci à vous **papa et maman** pour votre soutien sans faille et toute l'aide que vous m'avez apportée au cours de ces longues années d'études. Je sais tout ce que je vous dois. Et je remercie finalement **Maximilien**, pour la personne extraordinaire que tu es, et ton soutien durant les moments les plus difficiles. Il ne fait aucun doute que je n'aurais pas pu aller au bout de ma thèse si je ne t'avais pas rencontré. Merci pour ta bienveillance et ton amour.

Les figures ont été réalisées à l'aide de Biorender.com.

Je tiens à remercier l'Université de Lille d'avoir financé ma thèse.

En revanche, je ne remercie pas le Coronavirus qui m'a privé de beaucoup de congrès intéressants, d'opportunités de networking, de moments de partage avec mes collègues et qui a bien bousculé l'organisation de ma thèse.

Résumé

Dans le cerveau des malades atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), deux types de lésions coexistent : les dépôts parenchymateux formés d'agrégats de peptides amyloïdes (A β) et l'agrégation intra-neuronale de protéines Tau anormalement et hyperphosphorylées. Les peptides A β sont issus du clivage séquentiel de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) par deux enzymes, la β -secrétase et la γ -secrétase. En grande majorité, les molécules actuellement en essais cliniques ciblent l'une ou l'autre des deux pathologies, or la MA se définit par la co-existence de ces deux lésions. Ainsi, plusieurs études suggèrent un lien synergique entre les deux processus lésionnels, et un traitement qui agirait à la fois sur la pathologie amyloïde et sur la pathologie Tau apparaîtrait alors comme une stratégie thérapeutique de grand intérêt. Au carrefour de ces deux pathologies se trouve la régulation de l'homéostasie protéique faisant appel notamment au système endosome/lysosome. Plusieurs familles de molécules dérivées de la chloroquine issues du laboratoire agissent sur ce système endosome / lysosome essentiel au métabolisme de l'APP et au métabolisme de la protéine Tau. Une étude de la relation structure-activité de ces familles de molécules a été réalisée, et deux molécules, nommées MAGS et PEL, qui partagent un effet modulateur de la β -secrétase associé ou non à une activité lysosomotropique *in vitro* ont été identifiées. En termes de structure chimique, MAGS et PEL diffèrent uniquement par un atome d'azote. Ces molécules ont montré une capacité *in vitro* à bloquer la production de peptides A β . Identifier laquelle parmi plusieurs activités pharmacologiques *in vitro* est nécessaire pour obtenir l'efficacité désirée *in vivo* est essentiel pour la poursuite du développement de médicaments contre les processus physiopathologiques de la MA. Premièrement, ce travail a permis de démontrer que l'activité lysosomotropique n'était pas essentielle à l'efficacité de nos molécules *in vivo*, et qu'un traitement curatif avec la molécule PEL permettait de restaurer les fonctions cognitives, de diminuer l'hyperphosphorylation de Tau et la dégénérescence neurofibrillaire dans un modèle murin de pathologie Tau hippocampique. Deuxièmement, la molécule PEL a également permis une restauration complète de la mémoire à court et long-terme ainsi que la diminution de l'agrégation pathologique du peptide A β en plaques amyloïdes dans un modèle murin d'amyloïdogenèse. Enfin, nous avons pu mettre en évidence plusieurs voies sur lesquelles la molécule PEL pourrait agir, notamment la composante inflammatoire et en particulier l'astroglie dont la diminution significative a été constatée dans les deux modèles murins étudiés, ainsi que la protéine PP2A_C, principale phosphatase de Tau, dont la synthèse a été augmentée consécutivement au traitement avec PEL. Une augmentation de la protéine régulatrice du trafic endosomal de la β -secrétase, GGA1, a également été observée. Ce travail apporte des éléments nouveaux pour la compréhension de l'activité de nos molécules et suggère qu'au-delà de la modulation de l'activité β -secrétase, PEL possède une action sur l'astroglie et la réponse inflammatoire.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, molécules thérapeutiques, tauopathies, Tau, amyloïde, inflammation, autophagie

Abstract

In the brains of Alzheimer's disease (AD) patients, two types of lesions coexist: parenchymal deposits formed by amyloid peptide (A β) aggregates and intraneuronal aggregation of abnormally hyperphosphorylated Tau proteins. A β peptides are derived from the sequential cleavage of the APP protein by two enzymes, β -secretase and γ -secretase. The vast majority of molecules in clinical trials currently targets one or the other of the two pathologies, and AD is defined by the co-existence of these two lesions. Thus, several studies suggest a synergistic link between the two lesional processes, and a treatment acting on both amyloid pathology and Tau pathology would then appear as a highly interesting therapeutic strategy. At the crossroads of these two pathologies is the regulation of protein homeostasis, thanks to the endosome/lysosome system in particular. Several families of chloroquine-derived molecules developed in our laboratory act on this endosome/lysosome system, which is essential for the metabolism of the A β precursor protein (APP) and the metabolism of Tau protein. A structure-activity relationship-based study of these families of molecules has been carried out, and two molecules, named MAGS and PEL, that share a β -secretase modulating effect associated or not to a lysosomotropic activity *in vitro* have been identified. In terms of chemical structure, MAGS and PEL only differ by a single nitrogen atom. These molecules showed an *in vitro* ability to inhibit A β peptides production. Identifying which one among several *in vitro* pharmacological activities is necessary for the desired *in vivo* efficiency is essential for further drug development against AD pathophysiological processes. First, this work demonstrated that the lysosomotropic activity was not essential for the effectiveness of our molecules *in vivo*, and that a curative treatment with the molecule PEL restored the cognitive functions, decreased Tau hyperphosphorylation and neurofibrillary degeneration in a mouse model of hippocampal Tau pathology. Secondly, the molecule PEL also led to the complete restoration of short- and long-term memory as well as decreased A β peptide pathological aggregation into amyloid plaques in a murine model of amyloidosis. Finally, we were able to identify several pathways on which the molecule PEL could act, including neuroinflammation and particularly astrogliosis, which was significantly decreased in the two AD mice models we used, along with the protein PP2A_C, the main phosphatase of Tau, whose expression was increased following treatment with PEL. An increase in the protein regulating the endosomal trafficking of the β -secretase, GGA1, was also found. This work brings new elements to the understanding of the activity of our molecules and suggests that beyond the modulation of the β -secretase activity, PEL has an impact on astrogliosis and the inflammatory response.

Keywords : Alzheimer's disease, therapeutic molecules, tauopathies, Tau, amyloid, inflammation, autophagy

Résumé vulgarisé en français

La maladie d'Alzheimer (MA) est la démence neurodégénérative la plus fréquente de la personne âgée et un problème sociétal majeur. Dans le cerveau des malades, deux processus pathologiques coexistent : la pathologie amyloïde et la pathologie Tau. Le développement d'un médicament qui agirait à la fois sur la pathologie amyloïde et sur la pathologie Tau serait une stratégie thérapeutique de grand intérêt. A partir de plusieurs familles de molécules dérivées de la chloroquine et développées au laboratoire, deux molécules, PEL et MAGS, ont été synthétisées. Elles ne diffèrent que par un atome d'azote mais leur activité *in vitro* est très différente. Identifier laquelle parmi plusieurs activités pharmacologiques *in vitro* est nécessaire pour obtenir l'efficacité désirée *in vivo* est essentiel pour la poursuite du développement de médicaments contre les processus pathologiques de la MA. Cette étude a permis d'identifier l'activité nécessaire à l'efficacité de nos molécules *in vivo* et de montrer que la molécule PEL permet de diminuer la pathologie Tau ainsi que la pathologie amyloïde dans deux modèles de souris modélisant la MA. Ce travail apporte des éléments nouveaux pour la compréhension de l'activité de nos molécules thérapeutiques et suggère que PEL possède une action sur la réponse inflammatoire.

Vulgarized abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of dementia in elderly populations and a major societal problem. In the brain of AD patients, two pathological processes coexist: amyloid pathology and Tau pathology. The development of a treatment acting on both amyloid pathology and Tau pathology would be a highly interesting therapeutic strategy. From several families of molecules derived from chloroquine and developed in our laboratory, two molecules, PEL and MAGS, were synthesized. They differ only by one nitrogen atom, but their *in vitro* activity is very different. Identifying which one among several *in vitro* pharmacological activities is necessary for the desired *in vivo* efficiency is essential for further drug development against AD pathological processes. This study identified which activity was necessary for the efficiency of our molecules *in vivo* and showed that the molecule PEL reduces Tau pathology as well as amyloid pathology in two AD mice models. This work brings new elements to the understanding of the activity of our therapeutic molecules and suggests that PEL impacts the inflammatory response.

Sommaire

Remerciements	1
Résumé	4
Abstract.....	5
Résumé vulgarisé en français	6
Vulgarized abstract	6
Table des figures.....	10
Abbréviations	12
Introduction	15
Chapitre 1 : La maladie d’Alzheimer	15
I. Historique	15
1.1.1. Description clinique et découverte des lésions de la maladie d’Alzheimer.....	15
1.1.2. Caractérisation des lésions de la maladie d’Alzheimer	17
II. Lésions de la maladie d’Alzheimer et leurs caractéristiques biochimiques	19
1.2.1 Les plaques amyloïdes	19
1.2.2 Les enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau.....	21
1.2.3 Dysfonctionnement synaptique et mort neuronale	22
1.2.4 Dysfonctionnement de l’immunité cérébrale : le rôle des médiateurs de l’inflammation	26
III. Diagnostic clinique	30
1.3.1 Les tests comportementaux	31
1.3.2 L’imagerie médicale	32
1.3.3 Les biomarqueurs plasmatiques et du liquide cébrospinal	35
IV. Etiologie	37
1.4.1 La maladie d’Alzheimer d’origine génétique.....	37
1.4.2 L’hypothèse de la cascade amyloïde.....	38
1.4.3 La forme sporadique et les autres facteurs de risque liés à la MA	39
Chapitre 2 : La protéine Tau associée aux microtubules.....	43
I. Génétique et structure	43
2.1.1 Génétique de la protéine Tau	43
2.1.2 Structuration de la protéine Tau	44
II. Multiples fonctions de la protéine Tau.....	45
2.2.1 Tau et les microtubules	45
2.2.2 Fonctions atypiques de la protéine Tau	46
III. Modifications post-traductionnelles de la protéine Tau et implications des kinases/phosphatases.....	49
2.3.1 Sites de phosphorylation et phosphorylations pathologiques.....	49
2.3.2 Les kinases et phosphatases de la protéine Tau.....	50
2.3.3 Autres modifications post-traductionnelles de la protéine Tau	52
2.3.4 Les modifications post-traductionnelles et la dégénérescence neurofibrillaire	53
IV. Sécrétion et propagation de type prion de la protéine Tau	54

2.4.1	Sécrétion et internalisation de Tau par les neurones	54
2.4.2	Transmission de la protéine Tau entre les neurones.....	55
V.	Les tauopathies	57
Chapitre 3 : La protéine précurseur du peptide amyloïde		59
I.	Génétique et structure de l'APP.....	59
3.1.1	Gène et isoformes de l'APP	59
3.1.2	Structure de la protéine APP	60
II.	Fonctions et localisation cellulaire de l'APP	62
3.2.1	Localisation cellulaire et modifications post-traductionnelles de l'APP	62
3.2.2	Rôles physiologiques de la protéine APP.....	62
III.	Clivages et catabolites	64
3.3.1	Protéolyse amyloïdogénique et non amyloïdogénique : α -secrétase, β -secrétase et γ -secrétase.....	64
3.3.2	Les clivages non-conventionnels de l'APP	67
3.3.3	Le peptide A β : clivages, fonctions et propagation	69
3.3.4	Propriétés des autres catabolites de l'APP	73
IV.	Les protéases BACE	75
3.4.1	Structure des protéases BACE	75
3.4.2	Fonctions des protéases BACE	76
3.4.3	Autres substrats et inhibiteurs de BACE1	78
V.	Mutations et pathologies associées	79
Chapitre 4 : Le peptide amyloïde-β et la protéine Tau au carrefour de la maladie d'Alzheimer.....		81
I.	Dégradation de Tau et de l'APP : systèmes autophagiques	81
4.1.1	Les systèmes de dégradation cellulaire	81
4.1.2	Les voies de dégradation de la protéine Tau	85
4.1.3	Les voies de dégradation de la protéine APP	87
II.	La synergie entre la protéine Tau et le peptide amyloïde.....	89
4.2.1	Potentialisation mutuelle des lésions.....	89
4.2.2	Protéine Fyn et excitotoxicité synaptique	91
4.2.3	Interactions médiées par les kinases et phosphatases	93
4.2.4	Implication des médiateurs de l'inflammation	94
Chapitre 5 : La thérapeutique anti-Alzheimer		95
I.	Stratégies thérapeutiques existantes.....	95
5.1.1	Les thérapies ciblant le peptide A β	97
5.1.2	Les thérapies ciblant la protéine Tau.....	101
II.	Preuve de concept : les molécules MSBD (1 ^{ère} génération).....	105
III.	Les nouveaux composés PEL et MAGS (2 ^{ème} génération)	108
Objectifs		113
Matériel et Méthodes		115
I.	Les modèles transgéniques	115
1.1	Le modèle THY-Tau22	115
1.2	Le modèle APP ^{swe} /PS1 ^{dE9} (APP/PS1)	116

II.	Animaux	117
III.	Traitements avec les molécules	118
3.1	Les traitements des THY-Tau22 avec PEL et MAGS.....	118
3.2	Le traitement des APP/PS1 avec PEL	119
IV.	Tests de comportement	120
4.1	Motricité	120
4.2	Anxiété.....	120
4.3	Mémoire spatiale à court-terme	121
4.4	Mémoire spatiale à long-terme.....	121
V.	Sacrifice et préparation des tissus cérébraux	122
VI.	SDS-PAGE et Western Blot	122
4.1	Etude de la phosphorylation de la protéine Tau dans les THY-Tau22	122
4.2	Etude de la quantité de protéine APP et de ses métabolites dans les APP/PS1	123
VII.	Préparation de la fraction de Tau insoluble.....	124
VIII.	Électrophorèse bidimensionnelle.....	125
IX.	Immunohistochimie, immunofluorescence et analyse d'images	126
9.1	Quantification de la dégénérescence neurofibrillaire et de l'inflammation dans les THY-Tau22.....	126
9.2	Quantification des plaques amyloïdes et de l'inflammation dans les APP/PS1	127
X.	Extraction d'ARNm et analyse PCR quantitative en temps réel.....	129
XI.	Dosages ELISA	130
11.1	Dosage de la quantité de Tau totale dans le plasma des THY-Tau22	130
11.2	Dosage des A β 1-40 et A β 1-42 dans le plasma des APP/PS1.....	131
11.3	Dosage des A β 1-40 et A β 1-42 dans le tissu cérébral des APP/PS1	131
11.4	Dosage des oligomères A β dans le tissu cérébral des APP/PS1	132
XII.	Statistiques.....	132
	Résultats	134
I.	Etude de l'activité de PEL et MAGS sur le modèle THY-Tau22	134
II.	Etude de l'activité de PEL sur le modèle APP/PS1.....	149
	Discussion, conclusion et perspectives.....	164
	Bibliographie	179
	Annexes	266

Table des figures

Figure 1 : Photos représentant le Dr. Alois Alzheimer et sa patiente Auguste Deter en 1902, ainsi qu'une photo prise en 1910 d'Emil Kraepelin, à qui l'on doit le nom de maladie d'Alzheimer.....	16
Figure 2 : Illustration schématique de l'agrégation des protéines dans les troubles amyloïdes..	20
Figure 3: Evolution spatio-temporelle des lésions selon Braak et Thal..	22
Figure 4 : Schéma des différents acteurs du dysfonctionnement de la transmission synaptique.	26
Figure 5 : Schéma reliant la toxicité des plaques amyloïde, les acteurs de l'inflammation (astrocytes et microglie) et les conséquences sur les neurones adjacents.	30
Figure 6 : Imagerie IRM pondérée en T1 utilisant une séquence MPRAGE	32
Figure 7 : Images transaxiales FDG-PET d'un sujet témoin et d'un patient atteint de MA légère.....	33
Figure 8 : Images TEP PiB de sujets témoins normaux, de patients avec un début de MA (MCI) et de patients MA montrant différents stades de dépôts d'amyloïde- β	34
Figure 9 : La MA d'origine familiale et la MA d'origine sporadique et leurs causes sous-jacentes..	41
Figure 10 : Du gène MAPT à la protéine Tau.....	44
Figure 11: Représentation des différents domaines composant la protéine Tau ainsi que les sites de phosphorylation potentiels physiologiques et pathologiques présents sur chaque domaine.....	49
Figure 12 : Le gène APP et les différentes isoformes de la protéine APP.	61
Figure 13 : Les deux voies principales dans la protéolyse de l'APP.....	65
Figure 14 : Les différentes sous-unités du complexe γ -secrétase.....	67
Figure 15 : Les clivages non-conventionnels de la protéine APP.....	69
Figure 16 : Tableau récapitulatif des effets neurotrophiques et neurotoxiques des principaux fragments issus du clivage de l'APP.....	75
Figure 17: Caractéristiques structurales de la protéase BACE1.....	76
Figure 18 : Représentation schématique de la protéine précurseur d'amyloïde (APP), avec la séquence du peptide A β , et les sites de clivages α -, β - et γ -secrétase.....	81
Figure 19 : Les trois types d'autophagie : la macroautophagie (1), l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (2) et la microautophagie (3), et leur contribution à la dégradation des protéines et à l'élimination des organites dans les neurones.	82
Figure 20: Schéma illustrant l'interaction indirecte de A β et Tau médiée par Fyn à la synapse et le rôle central de cette kinase dans la signalisation des oligomères A β	92
Figure 21 : Présentation des composés en essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en 2020.....	96
Figure 22 : Les différentes approches thérapeutiques ciblant la protéine Tau.....	104
Figure 23: Les structures chimiques de la chloroquine et de l'amodiaquine, ainsi que les squelettes respectifs des MSBD et des PMAD.	108
Figure 24 : Schéma synthétique de l'approche de synthèse des molécules MAGS02-14 (MAGS) et PEL24-199 (PEL).	109
Figure 25 : MAGS et PEL augmentent les sAPP α et diminuent les sAPP β	110
Figure 26 : MAGS, mais pas PEL, mène à l'accumulation des vésicules autophagiques.....	110
Figure 27 : Le modèle murin THY-Tau22.....	116
Figure 28 : Le modèle murin APP/PS1.....	117
Figure 29 : Schéma illustrant le traitement administré aux souris THY-Tau22 et sa durée, ainsi que les tests comportementaux effectués avant le sacrifice.	119
Figure 30 : Représentation temporelle du traitement des souris APP/PS1 et des tests comportementaux.	120
Figure 31 : Représentation schématique des étapes de fractionnement utilisées pour obtenir la fraction insoluble de Tau dans le tissu cérébral des souris THY-Tau22.....	125
Figure 32 : Tableau des primers utilisés en qPCR..	130
Figure 33 : Quantification par chromatographie liquide et spectrométrie de masse des molécules PEL et MAGS dans le cerveau des animaux traités.	134
Figure 34 : Évaluation de l'anxiété des souris THY-Tau22 traitées ou non avec PEL ou MAGS.....	135
Figure 35 : PEL restaure la mémoire à court-terme dans le modèle de souris THY-Tau22.....	136

Figure 36 : PEL diminue la phosphorylation pathologique et l'hyperphosphorylation de Tau et augmente également la synthèse de PP2A_C.	137
Figure 37 : Le traitement avec PEL diminue la fraction de Tau phosphorylée insoluble chez les souris THY-Tau22.	139
Figure 38 : Analyse de l'insolubilité de Tau dans le cerveau des souris THY-Tau22 traitées avec MAGS.	140
Figure 39 : La pathologie Tau et l'astroglie sont réduites chez les souris THY-Tau22 traitées avec PEL.	141
Figure 40 : La pathologie Tau et l'astroglie demeurent inchangées dans les animaux THY-Tau22 traités avec MAGS.	143
Figure 41 : PEL et MAGS n'ont pas modifié les niveaux de synthèse de connexine43 dans les animaux THY-Tau22.	144
Figure 42 : Mesures ELISA quantitatives de la concentration plasmatique de Tau dans les souris THY-Tau22 WT, non traitées, traitées avec MAGS ou traitées avec PEL.	145
Figure 43 : PEL et MAGS n'ont pas modifié les niveaux de synthèse d'APP et de BACE1.	146
Figure 44 : PEL et MAGS n'ont pas modifié les niveaux de synthèse des marqueurs de l'autophagie	147
Figure 45 : PEL restaure la mémoire à court-terme et long-terme des souris APP/PS1.	149
Figure 46 : PEL réduit l'agrégation du peptide Aβ dans le modèle APP/PS1.	153
Figure 47 : Le traitement PEL diminue l'astroglie et l'inflammation dans les souris APP/PS1.	155
Figure 48 : Le traitement PEL augmente la synthèse des protéines PP2A_C et GGA1 chez les souris APP/PS1.	157
Figure 49 : Le traitement PEL augmente la synthèse de L1 dans le cortex.	159
Figure 50 : Le traitement PEL ne modifie pas les niveaux d'Aβ1-40, Aβ1-42 et des oligomères d'Aβ dans les souris APP/PS1.	160
Figure 51 : PEL n'a pas modifié les niveaux de synthèse des marqueurs de l'autophagie p62 et LC3.	161
Figure 52 : PEL n'a pas impacté les niveaux de synthèse de la protéine synaptique Fyn.	162
Figure 53 : PEL diminue le nombre de plaques amyloïdes et la phosphorylation de la protéine Tau probablement via une action sur la phosphatase PP2A et les acteurs de l'inflammation.	172

Abbreviations

Aβ : Amyloïde bêta	FDG : Fluorodéoxyglucose
ACE : Angiotensin I-Converting Enzyme	GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
ADAM : A Disintegrin and Metalloprotease	GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
ADAS-cog : Alzheimer's Disease Assessment Scale cognition	GSK-3β : Glycogen Synthase Kinase 3
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique	HSPG : Protéoglycanes à Héparane Sulfate
AEP : Asparagine Endopeptidase	IBA1 : Ionized Calcium-Binding Adapter molecule 1
AICD : APP Intracellular Domain	IDE : Insulin-Degrading Enzyme
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor	IL-1β : Interleukine 1- β
APH-1 : Anterior Pharynx defective-1	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
APLP : Amyloid Precursor-Like Protein	KPI : Kunitz Protease Inhibitor
APOE : APOlipoprotein E	LAMP2 : Lysosomal-Associated Membrane Protein
APP : Amyloid Precursor Protein	LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
BACE : β -site APP Cleaving Enzyme	LTD : Long-Term Depression
BHE : Barrière Hémato-encéphalique	LTP : Long-Term Potentiation
BIN1 : Bridging Integrator 1	MA : Maladie d'Alzheimer
BSA : Bovin Serum Albumin	MAPT : Microtubule-Associated Protein Tau
CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand	MCI : Mild Cognitive Impairment
CDK5 : Cyclin Dependent Kinase 5	MMP : Matrix Metalloproteinase
CMA : Chaperone-Mediated Autophagy	MMSE : Mini Mental State Examination
CTFα/β : Carboxy-Terminal Fragment alpha/beta	MTBD : Microtubule-Binding Domain
DAB : 3,3'-diaminobenzidine	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	NFT : Neurofibrillary Tangles
DNF : Dégénérescence Neurofibrillaire	NMDA : N-methyl-D-aspartate
FAD : Familial Alzheimer's Disease	PBS : Phosphate Buffered Saline
FTD : Frontotemporal Dementia	PiB : Pittsburg compound B

PKA: Protein Kinase A

PrPc: cellular Protease-resistant Prion Protein

PSEN1/2: Préséniline ½

PSP: Progressive Supranuclear Palsy

ROS/ERO: Reactive Oxygen Species/Espèces Réactives à l'Oxygène

sAPP α / β : soluble APP α / β

TDP-43: TAR-DNA-Binding Protein 43

TEP: Tomographie par Émission de Positons

TIP60: Tat-Interactive Protein 60

TLRs: Récepteurs Toll-Like

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TREM2: Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2

UPS: Ubiquitin-Proteasome System

INTRODUCTION

Introduction

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

I. Historique

1.1.1. Description clinique et découverte des lésions de la maladie d'Alzheimer

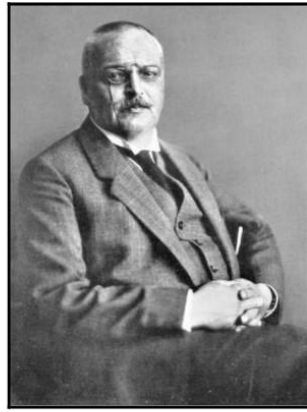
La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative avec une évolution lente et progressive. Elle tient son nom du neurologue et psychiatre allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915) qui, en étudiant le cas d'Auguste Deter, une patiente de 51 ans admise à l'hôpital de Frankfort pour cause de démence, associa ses symptômes de déclin progressif des fonctions cognitives à des lésions cérébrales spécifiques, les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (Figure 1).

Le 25 novembre 1901, à l'asile municipal d'aliénés et d'épileptiques de Francfort sur le Main, le Dr Aloïs Alzheimer, jeune psychiatre de 37 ans, voit en consultation une femme de 51 ans pour des troubles neurologiques. Cette patiente est adressée à l'hôpital psychiatrique car son mari qui n'arrive plus à gérer et à s'occuper de sa femme sujette à des troubles de la mémoire, un mutisme, une désorientation et des hallucinations. Lors de sa première prise de contact avec Auguste Deter, le Dr Alzheimer comprend vite qu'elle est complètement désorientée et qu'elle semble ne plus se souvenir clairement des détails de sa vie quotidienne. Pour le Dr Aloïs Alzheimer, la précocité de l'altération des fonctions cérébrales de sa patiente ne peut pas être simplement due à une démence sénile, mais plutôt à quelque chose d'autre qu'il nommera tout d'abord "la maladie de l'oubli". Après plusieurs mois d'hospitalisation, Auguste Deter continuera de sombrer et le Dr Alzheimer affinera son diagnostic. Il la décrit comme souffrant d'une aphasie, de désorientation, d'un délabrement psychosocial, de comportements imprévisibles et même d'hallucinations auditives ou de paranoïa.



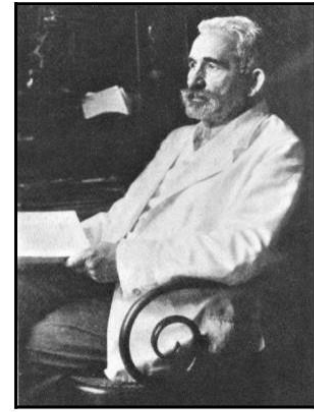
Auguste Deter (1902)

(16 Mai 1850 – 8 Avril 1906)



Alois Alzheimer

(14 Juin 1864 – 19 Décembre 1915)



Emil Kraepelin (1910)

(15 Février 1856 – 7 Octobre 1926)

Figure 1 : Photos représentant le Dr. Alois Alzheimer et sa patiente Auguste Deter en 1902, ainsi qu'une photo prise en 1910 d'Emil Kraepelin, à qui l'on doit le nom de maladie d'Alzheimer (source : worldhistoryproject.org).

C'est à la mort d'Auguste Deter, le 8 avril 1906 à l'âge de 51 ans d'une infection généralisée, que le Dr Alzheimer fera la demande à la famille de la défunte de récupérer son cerveau afin de l'analyser. Le neurologue allemand découvre lors de l'autopsie de son cerveau deux anomalies caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : un dépôt anormal d'une protéine à l'extérieur des neurones (les plaques séniles), et une dégénérescence des neurones (la dégénérescence neurofibrillaire). Ces observations sont présentées le 4 novembre 1906, lors de la 37e Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, en Allemagne. Puis en 1907, il fera la description dans un article de cette maladie du cortex cérébral caractérisée par des dépôts à l'intérieur et entre les cellules nerveuses. Il faudra attendre 1910 pour que cette maladie soit référencée dans un livre de psychiatrie écrit par Emil Kraepelin à laquelle il donnera le nom de son élève du laboratoire de Munich. Toutefois, d'autres scientifiques ont participé à cette découverte. Le psychiatre et neuropathologiste tchèque Oskar Fischer (1876-1942) a ainsi décrit la présence des plaques séniles dans le cerveau de 12 patients âgés atteints de démence, et le médecin italien Gaetano Perusini (1879-1915), collaborateur du Dr Alois Alzheimer, a également contribué fortement à la découverte de cette pathologie. Elle restera cantonnée pendant des dizaines d'années à un nombre de cas très limité. La dégénérescence observée par Alois Alzheimer est décrite comme une démence rare n'affectant que des personnes plutôt jeunes. Chez les sujets plus âgés, on préfère à cette époque parler de démence sénile, une pathologie de type vasculaire, considérée comme une conséquence naturelle du vieillissement (Cipriani et al., 2011).

1.1.2. Caractérisation des lésions de la maladie d'Alzheimer

Puis pendant plus d'un demi-siècle, l'étude de la maladie d'Alzheimer est restée en suspens. Enfin, le développement de nouveaux outils d'analyse comme la microscopie ou la coloration au rouge Congo a permis à d'autres neurologues et psychiatres de décrire plus précisément la MA. Les scientifiques se rendent compte finalement à partir des années 1970-1980 que cette distinction entre démences pré-sénile et sénile n'a pas de sens, et ils identifient une seule et même pathologie : la "maladie d'Alzheimer". Même si elle est plus souvent observée chez les personnes âgées, elle n'est plus tenue comme la conséquence logique du vieillissement des individus, et n'a rien à voir avec de simples troubles de la mémoire qui apparaissent parfois avec l'âge.

Une nouvelle dynamique de recherche est ainsi apparue grâce aux progrès de la médecine et en raison de l'augmentation des cas en lien avec le vieillissement de la population. Les constituants biologiques des deux lésions spécifiques de la maladie d'Alzheimer sont caractérisés : En 1963, Kidd et al. décrivent des filaments péri-nucléaires denses chez des patients Alzheimer (Paired helical filaments, PHFs)(Kidd, 1963), puis en 1975 Weingarten et ses collaborateurs décrivent une protéine essentielle pour la polymérisation des monomères de tubuline en *microtubules in vitro*, qu'ils vont appeler protéine Tau (Tubulin-associated unit) (Weingarten et al., 1975). En 1984 le pathologiste américain George Glenner isole et met en évidence le peptide bêta-amyloïde (A β) comme étant le constituant majeur des plaques amyloïdes (Glenner and Wong, 1984), et en 1985 le Dr. Jean-Pierre Brion démontre la présence de la protéine Tau anormalement phosphorylée accumulée dans les dégénérescences neurofibrillaires (Brion et al., 1985). En 1986, Grundke-Iqbal et son équipe mettent en évidence un état anormalement phosphorylé de Tau associé aux microtubules dans le cerveau des patients Alzheimer (Grundke-Iqbal et al., 1986). Kang et al. et Tanzi et al. localiseront en 1987 le gène codant pour le peptide A β sur le chromosome 21 (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987). Ils seront suivis en 1988 par Goedert et collaborateurs qui identifieront la séquence de Tau dans la composition des enchevêtrements neurofibrillaires (PHFs), une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Goedert et al, 1988), puis Braak et Braak en 1991 qui définiront le fait que la pathologie Tau suit une évolution spécifique décrite dans les stades de Braak (Braak and Braak, 1991).

La même année sont découvertes les mutations pathogènes sur le gène de l'APP situé sur le chromosome 21, capables de déclencher une MA précoce (Chartier-Harlin et al., 1991). Sur la

base de cette découverte, en 1992 Hardy et Higgins proposent l'hypothèse de la cascade amyloïde, plaçant le peptide bêta-amyloïde et les mutations de l'APP comme causes principales de la MA (Hardy and Higgins, 1992; Hardy and Selkoe, 2002).

Plus tard dans les années 1990, les progrès en génétique ont permis d'identifier plusieurs gènes au sein de certaines familles liés à l'apparition de la maladie, dont les gènes *PSEN1* et *PSEN2*, respectivement situés sur les chromosomes 1 et 14 (Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Ces gènes mutés sont responsables de formes familiales précoces de la maladie (avant 60 ans). En 1993, les scientifiques découvrent qu'un allèle du gène *APOE*, *Apoε4*, est le principal facteur de susceptibilité génétique dans le développement de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer, découverte confirmée par plusieurs laboratoires indépendants (Borgaonkar et al., 1993; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). L'*Apoε4* est un facteur de risque mais il n'est pas suffisant pour développer à lui-seul la maladie.

Aujourd'hui, la maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des démences, à l'origine de 60 à 70% des cas de démence (source : Organisation Mondiale de la Santé, OMS). Il y a environ 1 million de personnes atteintes de la MA en France, et 2 à 3 millions en incluant les proches aidants. Il s'agit donc de 8% des Français de plus de 65 ans qui seraient atteints en 2020, et on estime à 225 000 le nombre de nouveaux cas de MA diagnostiqués en France chaque année. Ce chiffre d'un million devrait augmenter à 2,1 millions de malades en 2040 chez les plus de 65 ans. Environ 10 millions de personnes souffrent de la maladie d'Alzheimer actuellement en Europe (source Alzheimer Europe), et selon le World Alzheimer Report 2015, près de 35 millions de personnes sont atteintes de maladie d'Alzheimer dans le monde. L'augmentation de l'espérance de vie dans les pays émergents accompagnée d'un manque d'accessibilité d'un diagnostic devrait contribuer à une augmentation continue et spectaculaire du nombre de personnes touchées par cette maladie dévastatrice (Alzheimer's Association, 2016). Chaque année, on dénombre 7,7 millions de nouveaux cas mondiaux et selon les prévisions de l'OMS, le nombre de malades devrait presque doubler tous les 20 ans. En conséquence, le coût social et économique de la maladie va également s'accroître, à moins que des mesures curatives ou de prévention efficaces soient découvertes dans un futur proche.

II. Lésions de la maladie d'Alzheimer et leurs caractéristiques biochimiques

La MA est une maladie neurodégénérative caractérisée par deux lésions histopathologiques : les dépôts amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau. Les dépôts amyloïdes ou plaques amyloïdes résultent de l'accumulation extracellulaire de peptides β -amyloïde ($A\beta$) (Glenner and Wong, 1984; Brion et al., 1985; Masters et al., 1985). La DNF (dégénérescence neurofibrillaire) est, elle, caractérisée par et des agrégats fibrillaires intraneuronaux de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées (Grundke-Iqbal et al., 1986).

1.2.1 Les plaques amyloïdes

La pathologie amyloïde (Delacourte et al., 2002) comprend l'ensemble des composantes génétiques, environnementales, cellulaires et moléculaires modifiant le métabolisme de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) vers la production de formes pro-agrégatives et synaptotoxiques de peptides $A\beta$, une inflammation et la formation des dépôts parenchymateux de substances amyloïdes. $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 sont deux formes du peptide $A\beta$ obtenues à la suite d'un clivage pouvant avoir lieu à deux endroits différents dans la séquence de la protéine APP (voir Chapitre 3.3.1).

L' $A\beta$ humaine peut exister dans divers états d'assemblage, y compris des monomères, des dimères, des trimères, des tétramères, des dodécamères, des oligomères d'ordre supérieur et des protofibrilles, ainsi que des fibrilles matures, qui peuvent former des plaques amyloïdes visibles au microscope dans les tissus cérébraux (Glabe, 2008) (Figure 2). L'agrégation d' $A\beta$ provient d'une modification des propriétés structurales du peptide : il s'enrichit en feuillets β et, devenu insoluble, il précipite dans le tissu nerveux sous l'influence de facteurs environnementaux et/ou l'augmentation de la concentration en monomère $A\beta$ (Fukuma et al., 2008). Les structures en feuillets- β entraînent l'exposition des régions hydrophobes qui sont normalement enfouies dans la structure de la protéine lorsqu'elle est dans sa conformation repliée nativement. Les structures hydrophobes ainsi exposées favorisent l'oligomérisation et l'agrégation de la protéine (Soto, 2003). Outre la différence au niveau de la formation des dimères, $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 s'agrègent en oligomères solubles par des voies distinctes (Bitan et al., 2003; Walsh and Selkoe, 2007). Des preuves récentes ont montré que la taille et l'hydrophobicité des agrégats jouent un rôle clé

dans leur neurotoxicité (Ahmed et al., 2019). À mesure que la taille des agrégats amyloïdes augmente, leur pouvoir toxique diminue (Mannini et al., 2014; Lo Cascio et al., 2020).

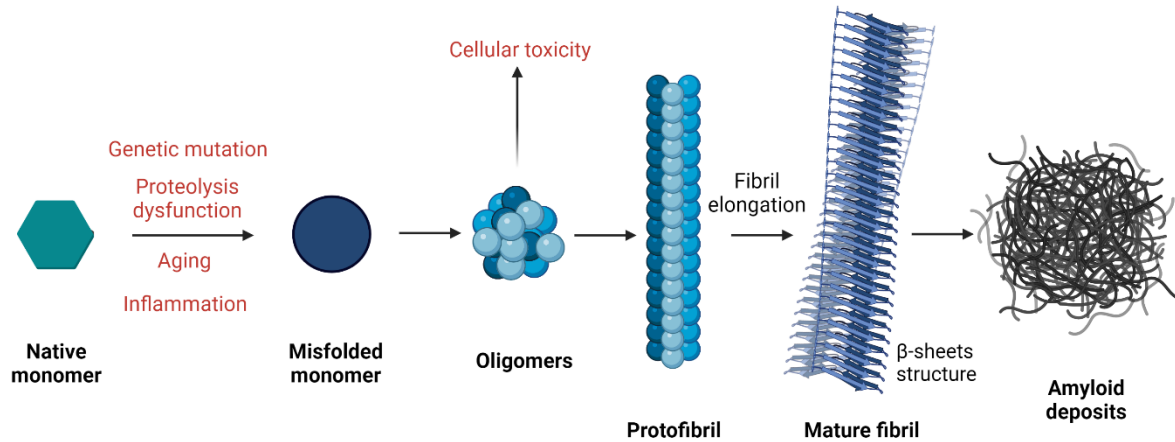


Figure 2 : **Illustration schématique de l'agrégation des protéines dans les troubles amyloïdes.** Les protéines natives se replient mal, subissent un changement de conformation ce qui augmente leur propension à l'agrégation et la formation d'oligomères. Les oligomères forment ensuite des protofibrilles et des fibrilles matures avec une structure en feuillets β . Les fibrilles matures peuvent éventuellement agir comme un modèle pour l'oligomérisation et catalyse la réaction de nucléation secondaire en formant des oligomères diffusibles à partir des monomères. Ces fibrilles finiront finalement par former des plaques amyloïdes (Verma et al., 2015).

Lors de son processus d'agrégation, le peptide $A\beta$ peut former des plaques séniles compactes avec un cœur dense amyloïde et des dépôts diffus, accompagné éventuellement d'une pathologie fréquemment associée à la MA, l'angiopathie amyloïde cérébrovasculaire. Contrairement à l' $A\beta$ 1-42 qui s'accumule dans les dépôts diffus et dans le cœur des plaques séniles compactes, l' $A\beta$ 1-40 a une propension à s'accumuler sur la couronne des plaques séniles et dans la paroi des vaisseaux cérébraux, menant à l'angiopathie amyloïde (Kumar-Singh, 2008). Les observations chez des souris bitransgéniques APP suggèrent que les plaques diffuses et les plaques compactes se formeraient via des processus indépendants, en fonction des mutations de l'APP (Lord et al., 2011).

Concernant la progression de la pathologie amyloïde, l'apparition des plaques amyloïdes est corrélée fonctionnellement et anatomiquement avec les régions cérébrales affectées (Thal et al., 2002). L'agrégation du peptide $A\beta$ affecte d'abord les couches II-V de l'isocortex, suivies du cortex entorhinal, de la formation hippocampique, de l'amygdale, des cortex insulaire et

cingulaire ; elle se propage ensuite aux noyaux sous-corticaux, y compris le striatum, les noyaux cholinergiques du cerveau antérieur basal, le thalamus, l'hypothalamus et la substance blanche. Alors que les NFT surviennent d'abord dans le locus coeruleus, le cortex entorhinal et les zones cérébrales limbiques telles que le subiculum de la formation hippocampique, l'amygdale, le thalamus et le claustrum, puis se propagent aux régions néocorticales interconnectées (Barrera Ocampo and Lopera, 2016).

1.2.2 Les enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau

L'accumulation intraneuronale d'agrégats de Tau insolubles, sous forme de filaments sous-tendent la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, une caractéristique pathologique de la maladie d'Alzheimer (MA) et de plusieurs autres tauopathies (Wang and Mandelkow, 2016; Goedert and Spillantini, 2019). L'accumulation intraneuronale d'espèces de Tau anormales est nécessaire pour le diagnostic post-mortem de la MA. Outre ces assemblages complexes de Tau, des espèces de Tau de plus petite taille, comprenant des oligomères et des fragments de Tau (monomères, dimères/trimères) contribuent également à la MA (Cowan and Mudher, 2013). En principe, Tau peut être impliquée dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives d'au moins trois manières : un processus pathologique peut soit bloquer une fonction de Tau critique (perte de fonction), changer Tau de manière à la transformer en effecteur ou médiateur pathogène (gain de fonction), ou encore nécessiter la présence de Tau dans sa forme native pour provoquer un dysfonctionnement (habilitation) (Chang et al., 2021).

Dans la MA, l'étendue des symptômes est étroitement corrélée à l'étendue anatomique et au nombre d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) dans le cortex (Ingelsson et al., 2004). Dans les premiers stades, les NFT apparaissent dans le locus coeruleus, puis sont limités au cortex entorhinal et au lobe temporal médian. Aux stades ultérieurs, lorsque les symptômes cliniques apparaissent généralement, les NFT s'étendent aux aires des cortex limbiques et associatifs (Braak and Braak, 1991). Si l'on associe la temporalité des deux lésions, la pathologie Tau débute dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (stades de Braak I à III ou IV) en l'absence de dépôts A β . La pathologie Tau est retrouvée plus tard dans l'isocortex (stades de Braak V et VI), associé à des dépôts d'A β (A β phase 1 ou plus) et des troubles cognitifs. À ces stades tardifs, la propagation de Tau du lobe temporal médian aux régions corticales positives pour l'amyloïde est fortement corrélée au déclin cognitif (Lam et al., 2021) (Figure 3).

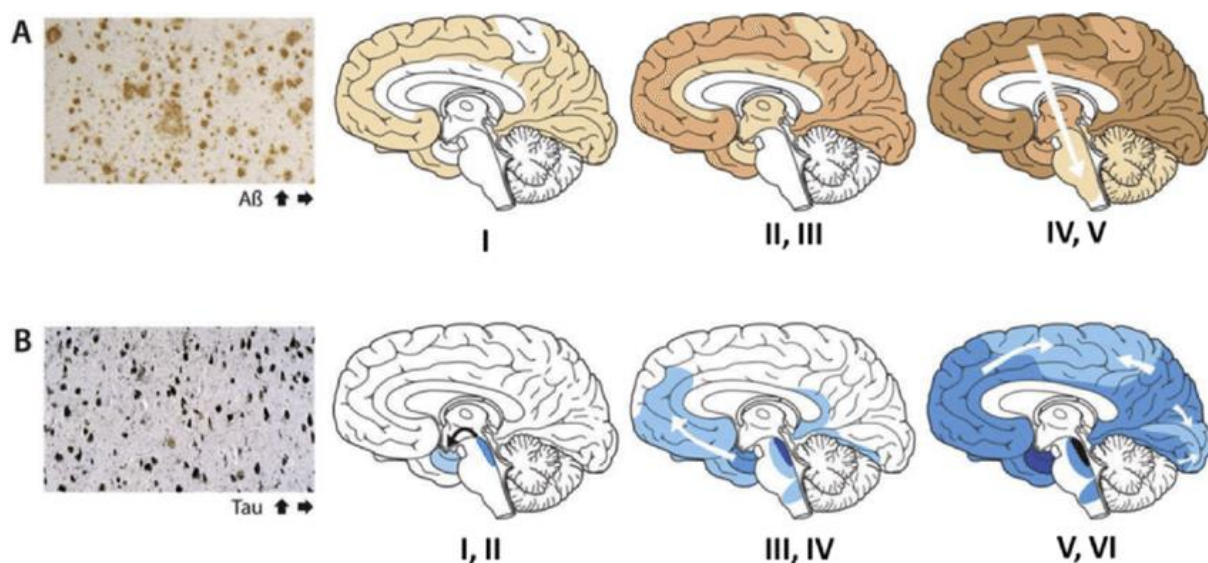


Figure 3: **Evolution spatio-temporelle des lésions selon Braak et Thal.** A : Les plaques amyloïdes et la progression des dépôts amyloïdes ; B : Les dégénérescences neurofibrillaires et la progression de la pathologie Tau (Jouanne et al., 2017).

D'abord identifiés comme un composant des plaques A β , les agrégats d' α -synucléine (Plaque-associated alpha-synuclein, NACP) sont détectés dans la majorité des cerveaux des patients atteints de MA. Comme le peptide A β , la protéine α -synucléine mal repliée forme des oligomères insolubles. Une autre protéinopathie courante provient du mauvais repliement de la protéine de liaison à l'ARN TAR 43 kDa (TDP-43), qui est principalement observée dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence frontotemporale (FTD). Dans la MA, la pathologie TDP-43 est observée dans environ 20 à 50 % des cas et environ 75 % des cas à un stade avancé (Chung et al., 2019).

1.2.3 Dysfonctionnement synaptique et mort neuronale

Les dysfonctionnements synaptiques et la perte synaptique sont des caractéristiques clés de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer qui surviennent aux premiers stades de cette dernière, tandis que des dépôts de peptide A β dans les plaques extracellulaires, une caractéristique majeure de la MA, ne sont retrouvés qu'à des stades plus avancés de la maladie (Terry et al., 1991; Selkoe, 2002). Des études chez l'animal ont montré que l'activité neuronale régule la production d'A β (Kamenetz et al., 2003; Cirrito et al., 2005) et que des taux élevés d'A β atténuent la transmission synaptique excitatrice en diminuant le nombre de récepteurs AMPA de surface (AMPA) et de récepteurs NMDA (NMDAR), associés à un effondrement des

épine dendritique glutamatergique (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2007). Chez les patients humains atteints de la maladie d'Alzheimer, une augmentation de l'A β est également associée à des dérangements complexes de l'activité neuronale. Par exemple, les régions hypométaboliques du cortex pariétal présentent des augmentations aberrantes de l'activité neuronale pendant le codage de la mémoire (Minoshima et al., 1997; Sperling et al., 2009), et les individus atteints de la maladie d'Alzheimer familiale présentent une activité épileptique dans le cerveau (Palop and Mucke, 2009).

Dans l'hippocampe, les neurones excitateurs glutamatergiques représentent 90 % de la population neuronale, tandis que les interneurons GABAergiques ne représentent qu'environ 10 % de tous les neurones (Pelkey et al., 2017). L'importance du peptide A β pour la signalisation GABAergique a été mise en évidence par l'hyperactivité du réseau à la fois chez les souris transgéniques surexprimant l'APP et chez les patients atteints de la MA (Zott et al., 2018). Ainsi, la dépression synaptique et les schémas aberrants de l'activité du réseau neuronal semblent coexister non seulement dans les modèles murins, mais également chez les humains. De nombreuses preuves suggèrent que les oligomères d'A β , qui sont des assemblages d'A β solubles allant des dimères aux espèces de haut poids moléculaire, sont plus puissants que les fibrilles d'A β et les dépôts amyloïdes pour provoquer des anomalies de fonctionnement synaptique et de l'activité du réseau neuronal chez la souris (Selkoe, 2008; Tomiyama et al., 2010), et chez l'humain (Shankar et al., 2008). Les effets délétères des oligomères d'A β se sont avérés être présents sur plusieurs étapes du trafic des vésicules synaptiques (Park et al., 2013). Les protéines présynaptiques telles que SNAP-25, la synaptophysine et la synaptotagmine sont présentes en plus faibles quantités dans le cerveau des patients atteints de MA (Reddy et al., 2005). Les oligomères d'A β provoquent différents types de défauts synaptiques, tels qu'une altération de la libération/capture des neurotransmetteurs, des modifications de la localisation cellulaire des récepteurs, des anomalies du cytosquelette et une perturbation de la plasticité synaptique, effets qui seraient à l'origine de déficits mnésiques, bien qu'ils n'aient jamais été prouvés chez les patients atteints de MA (Ricciarelli and Fedele, 2017).

Dans les modèles murins, l'augmentation de l'activité neuronale potentialise la production d'A β et le blocage de l'activité neuronale a l'effet inverse. Ces résultats soutiennent l'idée que APP et A β font partie d'une boucle de rétroaction qui contrôle l'excitabilité neuronale (Palop and Mucke, 2010). Tandis que l'application de faibles concentrations d'A β (picomolaire), ressemblant aux niveaux endogènes d'A β dans le cerveau, potentialise considérablement la transmission synaptique, des concentrations plus élevées (nanomolaire-micromolaire) d'A β

provoquent une dépression synaptique (Puzzo et al., 2008). Des niveaux d'Aβ pathologiquement élevés peuvent indirectement provoquer un blocage partiel des récepteurs NMDA et déplacer l'activation des cascades de signalisation dépendantes des récepteurs NMDA vers des voies impliquées dans l'induction de la LTD (long-term depression) et la perte synaptique (Shankar et al., 2007). Ce modèle est cohérent avec des études montrant que l'Aβ altère la LTP (long-term potentiation) (Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005) et améliore la LTD (Hsieh et al., 2006; Li et al., 2009). Bien que les mécanismes sous-jacents à la LTD induite par les peptides Aβ n'aient pas encore été complètement élucidés, ils pourraient impliquer la protéine Fyn. En effet, la toxicité post-synaptique de l'amyloïde est Tau-dépendante, et médiée par la protéine Fyn. Fyn augmente les courants calciques médiés par les récepteurs NMDA, module la libération de calcium et intensifie la transmission synaptique (Lu et al., 1999) (voir Chapitre 4 partie 2). Les peptides Aβ vont compromettre la liaison de Tau aux microtubules et empêcher le transport axonal des mitochondries, ce qui peut lier deux hypothèses : l'hypothèse de "l'altération du transport axonal", selon laquelle Tau induit une défaillance du transport axonal et l'hypothèse du "stress oxydatif", selon laquelle les mitochondries - étant une cargaison de transport axonal essentielle - sont fonctionnellement altérées, entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO/ROS)(Ittner and Götz, 2011).

La période d'incubation silencieuse de la MA ne trouve pas d'explication dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. Les mécanismes de compensation dans le cerveau et l'homéostasie maintiennent des performances cognitives quasi normales pendant des décennies (De Strooper and Karran, 2016). Le système lysosomal/endolysosomal et, en particulier, l'autophagie est un régulateur clé de ce stade protéopathique (Nixon, 2013). Dans les cerveaux atteints de MA, une augmentation frappante des autophagosomes est observée à un stade précoce de la maladie (Nixon, 2013). Ce n'est que lorsque ces mécanismes de compensation se transforment en processus chroniques, irréversibles et pathologiques que la maladie débute sa progression inexorable. La formation de protéines agrégées pourrait être une stratégie protectrice des neurones vieillissants (Penke et al., 2017). En effet, la formation de plaques séniles est supposée être un mécanisme adaptatif pour séquestrer l'excès d'oligomères solubles toxiques tout en laissant les niveaux d'Aβ fonctionnels natifs intacts. Cette hypothèse est renforcée par l'absence de résultats positifs et d'effets secondaires des essais cliniques d'immunothérapie visant à une clairance complète de l'Aβ et soutient les rôles physiologiques bénéfiques de l'Aβ natif dans la fonction cellulaire (Karisetty et al., 2020).

Il existe de nombreuses hypothèses sur la genèse des tous premiers éléments perturbateurs dans la MA : un dysfonctionnement des synapses cholinergiques (Bierer et al., 1995), une hypoxie dans le cerveau, des problèmes de signalisation du calcium, d'homéostasie mitochondriale, de stress chronique du réticulum endoplasmique, une diminution de la clairance des protéines ou plusieurs de ces facteurs cumulés (Figure 4). Le peptide A β joue un rôle dans l'induction d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la MA : il rentre dans les mitochondries, présentes essentiellement dans les synapses, induit la formation des radicaux libres, causant des dommages oxydatifs et inhibant l'ATP cellulaire, la diminution de la production d'ATP pouvant causer la défaillance de la neurotransmission (Reddy and Beal, 2008). En effet, A β interagit avec VDAC1, bloquant le transport des protéines mitochondriales et conduisant à une phosphorylation oxydative défectueuse, qui peut à son tour induire une augmentation de la production de radicaux libres (Manczak and Reddy, 2012). L'augmentation des dommages oxydatifs est présentée actuellement comme étant l'un des premier événements pathologiques de la MA (Nunomura et al., 2001).

Le peptide β -amyloïde mais également la protéine Tau hyperphosphorylée ont des effets cytotoxiques directs et indirects qui affectent la neurotransmission, le transport axonal, les cascades de signalisation, la fonction des organites et la réponse immunitaire de manière à entraîner une perte synaptique et des dysfonctionnements dans la libération des neurotransmetteurs. Les oligomères de Tau se sont révélés être également de puissants inhibiteurs de la LTP. Les enchevêtrements exercent des effets neurotoxiques faibles par rapport à la Tau soluble (Santacruz et al., 2005). Dans les neurones sains, il y a une plus grande quantité de Tau dans les axones que dans les compartiments somatodendritiques, mais dans les maladies neurodégénératives, ce gradient est inversé, perturbant potentiellement le transport axonal et permettant l'accumulation d'agrégats de protéine Tau toxiques. Les troubles synaptiques apparaissent avant même la perte des synapses, étape clé dans la transition entre la phase asymptomatique et la phase symptomatique (Hoover et al., 2010).

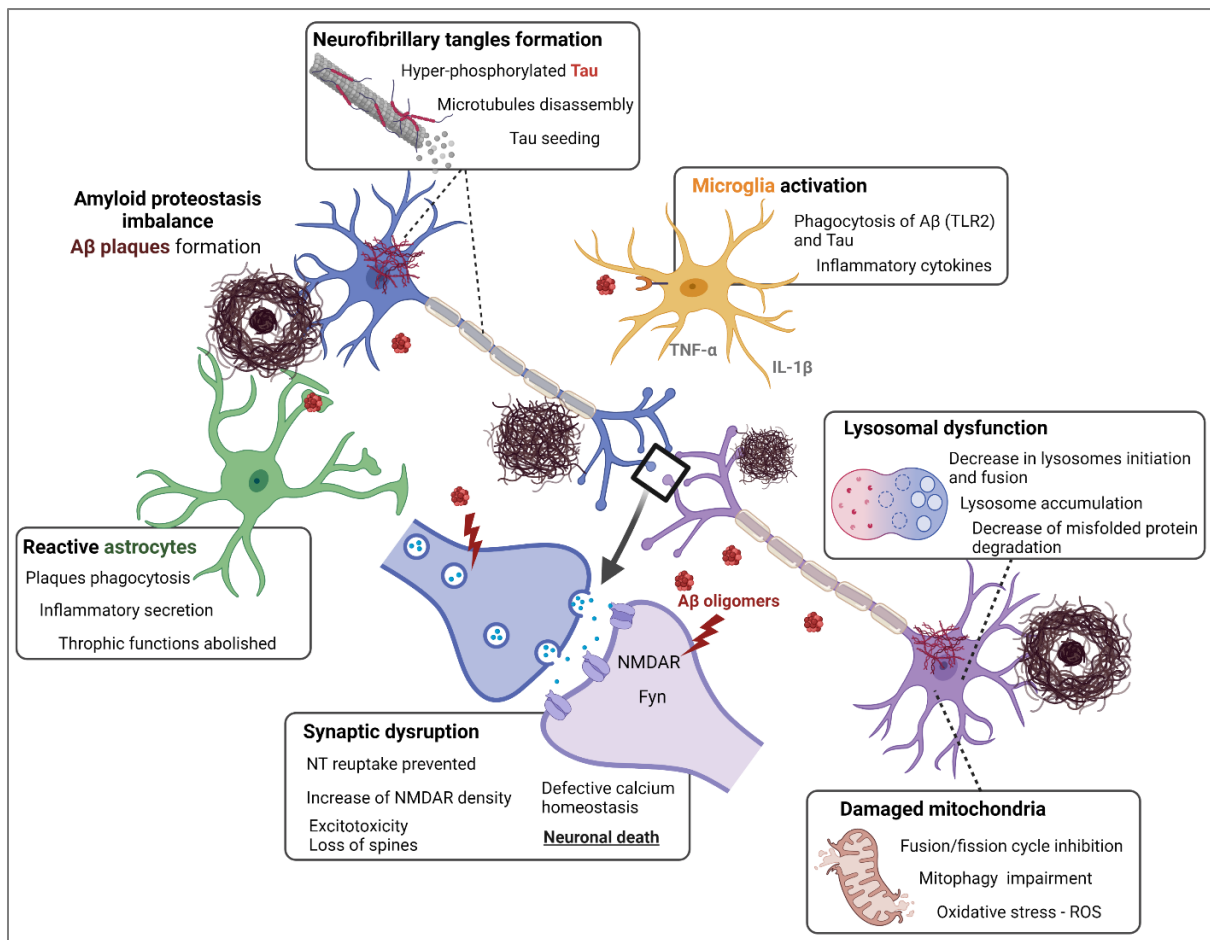


Figure 4 : **Schéma des différents acteurs du dysfonctionnement de la transmission synaptique.** L'amyloïde- β est libéré d'une manière dépendante de l'activité neuronale. Les plaques amyloïdes contiennent des dépôts d'A β entourées de fortes concentrations de formes solubles, ce qui endommage les synapses proches et aggrave probablement encore la libération d'A β . L'intervention des acteurs de l'inflammation est bénéfique en premier lieu, puis devient un cercle vicieux en augmentant la libération de cytokine pro-inflammatoire (IL-1 β , TNF- α). En fonction de l'efficacité microgliale et astrocytaire, l'influx de Ca²⁺ et le dysfonctionnement mitochondrial, lysosomal et synaptique se propagent le long des axones ou se limitent à la proximité immédiate des plaques (NT : neurotransmetteurs).

1.2.4 Dysfonctionnement de l'immunité cérébrale : le rôle des médiateurs de l'inflammation

Les astrocytes

On pourrait penser que les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer sont des pathologies principalement neuronales, mais des preuves récentes ont montré que les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie jouent un rôle prépondérant dans le développement du dysfonctionnement neuronal à l'origine de ces maladies (Kovacs et al., 2017). A l'appui de cela, de nombreuses études suggèrent que les composantes inflammatoires sont modifiées dans la maladie d'Alzheimer. Premièrement, les cellules inflammatoires (astrocytes et microglie), les cytokines, chimiokines et les molécules du complément sont retrouvés à des niveaux plus

élevés dans les cerveaux des malades d'Alzheimer par rapport aux cerveaux témoins (McGeer and McGeer, 2001). Deuxièmement, une autre étude a montré que les astrocytes activés sont abondants autour des plaques amyloïdes dans le cortex entorhinal des personnes atteintes de la MA, et que les astrocytes sont capables de phagocyter ces plaques composées d'A β 1-42 et de les dégrader via les lysosomes (Funato et al., 1998; Nagele et al., 2003). Des études récentes suggèrent ainsi que la première étape de la pathologie astrocytaire pourrait être l'accumulation de protéines mal repliées comme une tentative de contenir les dommages à l'intérieur des astrocytes, tel que des fragments A β ou des dépôts de protéine Tau par micropinocytose (Ikeda et al., 2016; Garwood et al., 2017; Martini-Stoica et al., 2018). De manière réciproque, l'accumulation d'astrocytes sénescents favoriserait la formation d'agrégats de Tau hyperphosphorylés chez la souris (Bussian et al., 2018). De plus, dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer dans différents modèles murins, une hyperactivité astrocytaire est présente dès le début de la pathologie amyloïde (Dudal et al., 2004) et Tau (Yoshiyama et al., 2007), bien avant que l'inflammation ne devienne perceptible.

En tant que composant important de la synapse tripartite, les astrocytes maintiennent l'homéostasie dans le système nerveux central par une diversité d'actions et de rôles, notamment le contrôle du flux sanguin, la modulation de la neurotransmission, l'absorption d'ions et de glutamate, l'apport métabolique ou encore la défense oxydative (Haydon, 2001; Ren et al., 2018). Au cours du développement de la MA, les astrocytes subissent une transformation dramatique appelée "astrocytose réactive" et activent de nombreux gènes (Zamanian et al., 2012). Les fonctions des astrocytes réactifs ont fait l'objet de nombreux débats, des études antérieures montrant alternativement qu'ils entravent ou soutiennent la récupération du système nerveux central (SNC) (Martinez and Gordon, 2014; Heppner et al., 2015; Anderson et al., 2016).

Les astrocytes sont maintenant reconnus pour contribuer aux réponses neuro-inflammatoires qui accélèrent la progression des maladies neurodégénératives chez l'humain (Bouvier et al., 2016). Les astrocytes réactifs sont des astrocytes subissant un remodelage morphologique, moléculaire et fonctionnel en réponse à une blessure, une maladie ou une infection du SNC. Il avait été communément accepté jusqu'à récemment qu'il existait deux types d'astrocytes réactifs : le type A1, neurotoxique et destructeur pour les synapses, libérant des cytokines pro-inflammatoires, des ROS et perdant la plupart des fonctions trophiques des astrocytes ; et le type A2, au contraire protecteur et augmentant l'expression de nombreux gènes bénéfiques pour

les neurones (Reid et al., 2020). Les marqueurs des astrocytes A1 sont certes régulés à la hausse dans la MA, et ce phénotype serait induit par la microglie activée (Liddelow et al., 2017). Cependant, il a été démontré qu'il existe un spectre d'états astrocytes réactifs dans différentes régions du cerveau, tout au long du vieillissement et de la progression de la maladie, similaire aux réponses microgliales dynamiques de la maladie. Il n'y aurait donc pas d'astrocyte réactif prototype, et les astrocytes réactifs ne se polarisent pas en phénotypes binaires simples, tels que A1-A2, bon-mauvais ou neurotoxique-neuroprotecteur. Au contraire, les astrocytes réactifs peuvent adopter plusieurs états selon le contexte, avec seulement une fraction de changements communs entre les différents états (Habib et al., 2020; Escartin et al., 2021).

La microglie

Dans le cas de la MA, la concentration et l'activation de la microglie autour des plaques amyloïdes ont été démontrées à l'origine par Alois Alzheimer et ont été depuis régulièrement observées (Cipriani et al., 2011). L'homéostasie cérébrale est surveillée en permanence par la microglie, qui sont des macrophages résidant dans les tissus cérébraux qui exécutent un large éventail de fonctions cellulaires, y compris le soutien trophique des neurones, la réponse immunitaire aux blessures et aux infections, et la clairance phagocytaire des synapses et autres débris cellulaires (Crotti and Ransohoff, 2016). De manière similaire aux astrocytes, la microglie répond aux altérations de l'homéostasie du tissu cérébral en modifiant son expression génique et sa morphologie, un processus appelé "microgliose réactive" (Figure 5). Ainsi, ces cellules activées sont appelées "microglie associée à la dégénérescence ou à la maladie" (Disease associated microglia, DAM). Cette microglie activée peut remplir différentes fonctions et exercer à la fois des effets positifs et négatifs dans différents modèles de maladies murines. Notamment, le récepteur TLR2 est essentiel dans l'activation microgliale induite par A β (Jana et al., 2008; Liu et al.). L'activation continue de TLR2 contribue au développement de la neuroinflammation et de la pathologie (McDonald et al., 2016a). Dans la MA, ces microglies réactives se trouvent en abondance autour des plaques pathologiques d'amyloïde- β (Itagaki et al., 1989), et des études "-omiques" du cerveau humain ont révélé que les changements de la microglie constituent les signaux transcriptionnels et épigénétiques les plus forts de la MA et du vieillissement normal (Ris et al., 1975; Zhang et al., 2013; Huang et al., 2017).

L'autophagie microgliale joue un rôle modulateur dans l'internalisation et l'absorption d'A β , et a probablement un impact sur la dégradation ou la formation de plaques amyloïdes, les déficits de l'autophagie microgliale contribuant à la progression de la maladie. La microglie permet d'éliminer le peptide A β , un processus qui a été largement étudié (Bates et al., 2009; Lee et al., 2010a; Baranello et al., 2015). La microglie peut sécréter des protéinases, telles que la néprilysine, une enzyme de dégradation de l'insuline et la MMP9, qui dégradent directement l'A β soluble (Qiu et al., 1998; Iwata et al., 2001; Yan et al., 2006). Plus généralement, la microglie est présumée internaliser et dégrader A β grâce au récepteur TREM2 (Song and Colonna, 2018; Zhao et al., 2018). Des études de génétique chez l'Homme ont prouvé l'effet important des mutations perte de fonction du gène *Trem2* sur le risque de MA et sur la fonction microgliale et soutiennent que la microglie a une fonction protectrice qui réduit l'incidence de la MA (Dourlen et al., 2019).

La microglie peut également éliminer les agrégats de protéine Tau en les phagocytant et en les dégradant (Luo et al., 2015; Bolós et al., 2016; Hopp et al., 2018). D'autre part, la microglie peut également être un ennemi dans la propagation de la pathologie Tau en phagocytant Tau et en le libérant dans l'espace extracellulaire (Asai et al., 2015). Il semble qu'aux premiers stades de la MA, la réponse neuro-inflammatoire puisse être protectrice, contribuant initialement au maintien de l'homéostasie. L'activation continue des cellules gliales au cours de la maladie, cependant, peut conduire au développement d'une inflammation chronique dysfonctionnelle qui exacerbe les pathologies Tau, amyloïde et la perte synaptique (Hansen et al., 2018). Par exemple, les molécules du complément C1q et C3 et la microglie qui élaguent les synapses en excès au cours du développement se retrouvent activées de manière inappropriée dans la MA et médient la perte synaptique et le déclin cognitif associé (Hong et al., 2016). Il est très probable qu'une fois que les altérations inflammatoires ont commencé, elles conduisent à un cercle vicieux qui entretient les processus liés à la MA (Wyss-Coray, 2006).

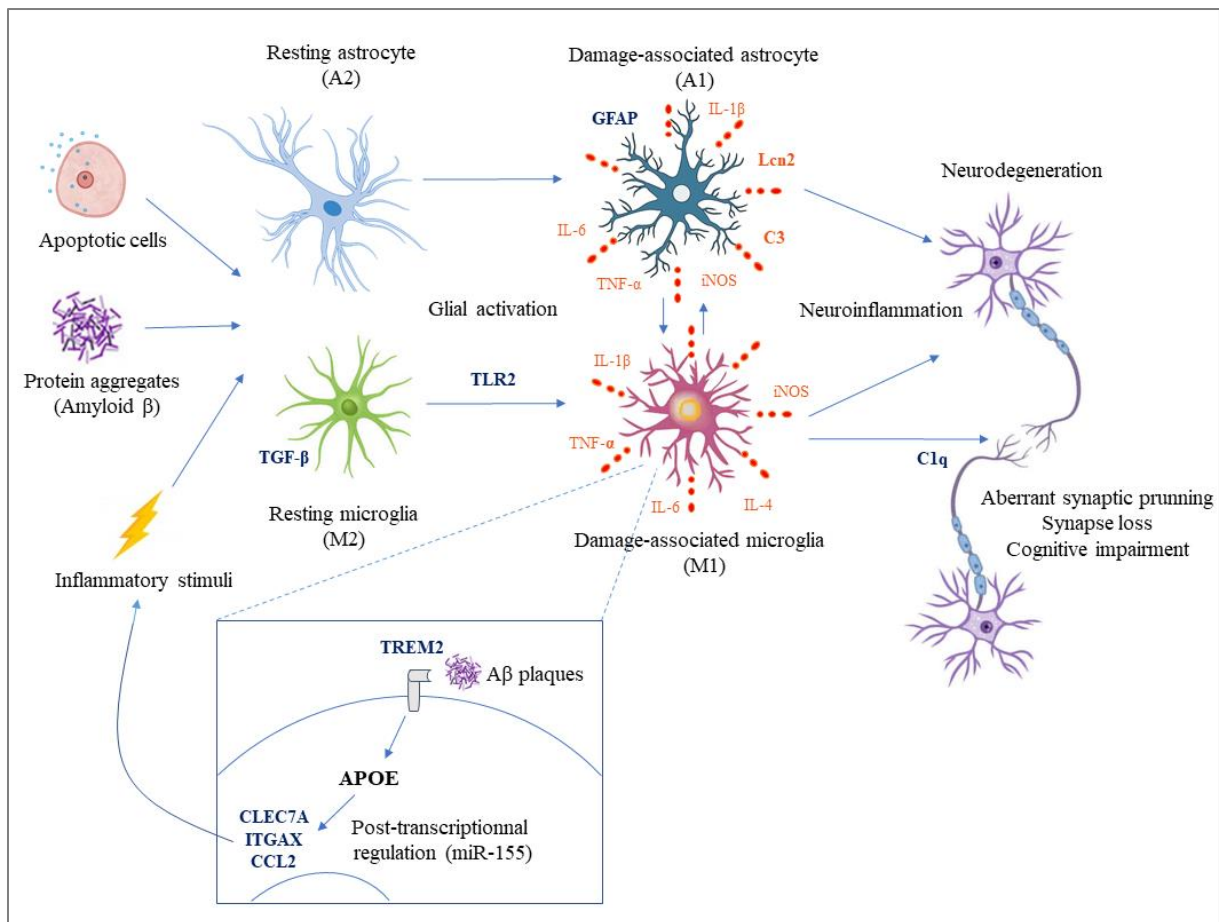


Figure 5 : **Schéma reliant la toxicité des plaques amyloïde, les acteurs de l'inflammation (astrocytes et microglie) et les conséquences sur les neurones adjacents.** Certains facteurs déclencheurs comme des signaux apoptotiques, des agrégats d'Aβ ou des stimuli inflammatoires vont convertir les astrocytes et la microglie en cellules inflammatoires activées, avec un spectre d'états intermédiaires. Les microglies sont attirées par les plaques et phagocytent ainsi les synapses endommagées grâce au récepteur TREM2, offrant ainsi une protection dans un premier temps contre des dommages plus importants. Cette suractivité inflammatoire finit à terme par endommager les connections synaptiques et les neurones, alimentant la perte synaptique et les déficits mnésiques associés.

III. Diagnostic clinique

Certains changements dans le cerveau peuvent débuter 10 à 20 ans avant l'apparition d'une quelconque manifestation clinique. La progression de la démence à un stade léger (mild stage) dure en 2 et 5 ans et est mise en évidence par une amnésie (perte partielle ou totale de la mémoire), accompagnée de troubles du langage, de changements de personnalité et d'une désorientation visuospatiale, entre autres. A ce moment, la personne et sa famille sont conscients de la maladie et le diagnostic clinique probable est en général posé. Au stade modéré de la maladie qui peut durer entre 2 et 4 ans, les dommages se sont étendus aux régions du cortex cérébral qui contrôlent le raisonnement, le langage, entraînant une aphasie (perte de la

faculté de s'exprimer ou de comprendre le langage), mais également le traitement des entrées sensorielles ce qui va conduire à une agnosie (trouble de la reconnaissance des visages, des odeurs, des sons, des goûts...). Les symptômes de la maladie sont plus prononcés et une supervision du patient devient nécessaire. L'interruption de la communication neuronale peut causer de la paranoïa, des hallucinations, des accès de colère mais également une apraxie (difficulté à effectuer des gestes précis) ce qui va détériorer la possibilité d'effectuer des tâches quotidiennes comme s'habiller, lire ou écrire. Le stade sévère de la maladie est caractérisé par une atrophie étendue du cortex cérébral et un élargissement des ventricules (Barrera Ocampo and Lopera, 2016). Cette atrophie de l'hippocampe peut être mesurée grâce à l'échelle de Scheltens qui note le stade de l'atrophie de l'hippocampe de 0, absence d'atrophie, à 4, atrophie très sévère (Scheltens et al., 1993). Au stade sévère, le patient est totalement dépendant et est incapable de reconnaître ses amis et sa famille.

1.3.1 Les tests comportementaux

Plusieurs tests médicaux permettent de construire un diagnostic de MA relativement fiable (Rossini et al., 2020), malgré le fait que le diagnostic certain ne pourra être posé que post-mortem à la découverte dans le cerveau du patient des lésions caractéristiques, les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires. Le cheminement médical commence généralement par des examens comportementaux, consistant en un ou plusieurs tests mnésiques. Il en existe un grand nombre, comme le MMSE (Mini Mental State Examination), qui consiste en une série de questions permettant d'apprécier la coordination du patient, sa capacité à compter, à restituer des événements généraux et à raisonner (Derouesne et al., 1999). Il existe également le CDR-SB (Clinical Dementia Rating Sum of Boxes) (Cedarbaum et al., 2013) ou l'ADAS-Cog (The Alzheimer's Disease Assessment Scale–Cognitive Subscale), une échelle conçue aux USA par Rosen et al. en 1984 (Rosen et al., 1984; Kueper et al., 2018). Si le neurologue soupçonne un début de MA, il peut prescrire des tests plus poussés, comprenant notamment de l'imagerie, des ponctions lombaires ou des analyses sanguines à la recherche de biomarqueurs caractéristiques. Les biomarqueurs actuels mesurent les niveaux d'Aβ1-40, Aβ1-42 et de la protéine Tau dans le plasma et le liquide cébrospinal (Ashton et al., 2020; Barthélemy et al., 2020; Palmqvist et al., 2020). Les études d'imagerie (IRM et TEP) complètent généralement ces analyses de biomarqueurs. Dans la maladie d'Alzheimer, ces biomarqueurs sont corrélés avec la progression de la maladie (La Joie et al., 2020; Leuzy et al., 2020; Chang et al., 2021).

1.3.2 L'imagerie médicale

Il existe une variété de modalités d'imagerie, incluant l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) structurale et fonctionnelle ou la Tomographie à Emission de Positron (TEP). Concernant la MA, l'IRM structurale peut être divisée en l'évaluation de l'atrophie progressive cérébrale (séquences volumétriques pondérées en T1) (Figure 6) et l'étude des changements dans les caractéristiques des tissus comme la substance blanche (IRM pondérée en T2). La contribution majeure à l'atrophie est la perte neuronale et dentritique. Le cortex entorhinal est le premier site d'atrophie, suivi de près par l'hippocampe et l'amygdale (Lehéricy et al., 1994). Ces pertes neuronales s'étendent ensuite dans le néocortex temporal, suivant ainsi les études histopathologiques qui ont décrit la diffusion des dégénérescences neurofibrillaires (Braak and Braak, 1991). Il est maintenant clair qu'au moment où un patient Alzheimer typique reçoit son diagnostic, l'atrophie cérébrale est déjà bien avancée. En effet, le volume cérébral a diminué en moyenne de 6% (Ridha et al., 2006), et l'atrophie du lobe temporal médian est maintenant proposé en tant que critère de diagnostic de la MA (Dubois et al., 2007), car les études ont montré que l'atrophie était le facteur qui était le mieux corrélé aux déficits cognitifs à tout âge (Savva et al., 2009).

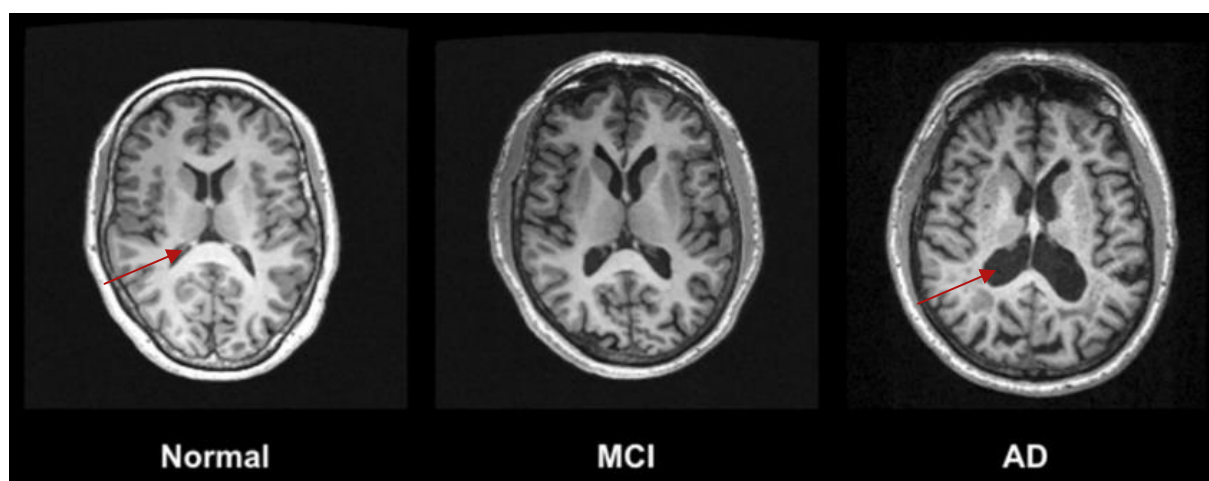


Figure 6 : **Imagerie IRM pondérée en T1 utilisant une séquence MPRAGE** (Magnetisation Prepared Rapid Gradient Echo) montrant une diminution du volume de substance grise chez un patient atteint de MA par rapport à un contrôle sain et un déclin intermédiaire de la substance grise chez un patient avec un début de MA (ici AD, Alzheimer's disease) ou MCI (mild-cognitive impairment). L'élargissement des ventricules consécutif à cette perte de substance grise est indiqué par des flèches rouges (Chandra et al., 2019).

L'IRM fonctionnelle (IRMf) permet de donner une mesure de l'activité neuronale, déduit de la mesure des changements du niveau d'oxygène dans le sang au niveau cérébral (BOLD fMRI, Ogawa et al., 1990; Kwong et al., 1992). L'IRMf peut être enregistrée durant des tâches cognitives, et chez les patients de la MA une diminution de l'activité de l'hippocampe durant les phases d'encodage de nouvelles informations a été détectée (Small et al., 1999; Hämäläinen et al., 2007), et plusieurs études ont montré une augmentation de l'activité du cortex préfrontal, possiblement dans un mécanisme compensatoire (Grady et al., 2003).

Le fluoro-deoxy-D-glucose (FDG)-TEP est connu pour mesurer l'activité synaptique, s'appuyant sur le fait que le glucose est la principale source d'énergie du cerveau, et l'analogue du glucose FDG est un indicateur fiable du métabolisme cérébral quand il est couplé au fluor-18 (demi-vie 110 min). Les régions limbiques et associatives sont typiquement hypométaboliques chez les patients atteints de la MA (Foster et al., 1983; De Santi et al., 2001), et cela s'aggrave durant la progression de la maladie (Figure 7). Le FDG est donc un marqueur robuste de neurodégénération car il a été montré que l'hypométabolisme précède dans certains cas l'apparition des symptômes cognitifs et peut prédire le taux de déclin cognitif progressif chez les personnes qui se sont révélées plus tard avoir progressé vers la MA (de Leon et al., 2001; Jagust et al., 2006). Plusieurs groupes ont observé un dépôt élevé d'amyloïde dans les régions pariétales qui colocalise avec l'hypométabolisme observé en présence de FDG, indiquant possiblement une toxicité locale (Klunk et al., 2004; Cohen et al., 2009).

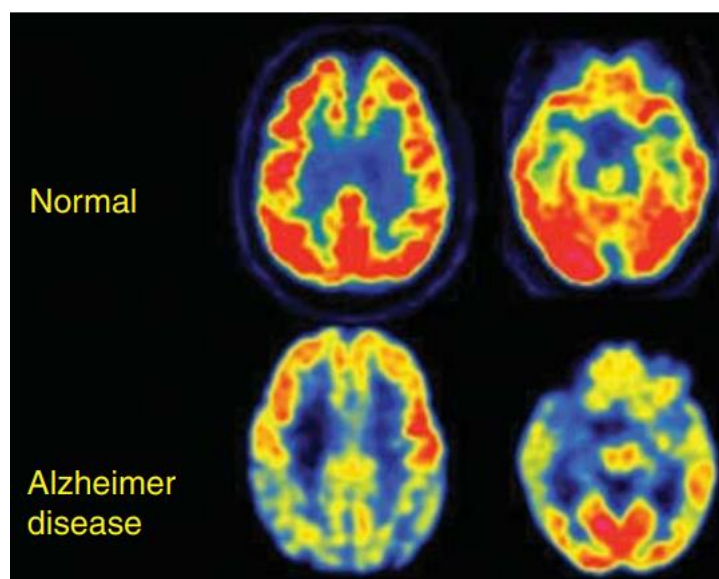


Figure 7 : **Images transaxiales FDG-PET d'un sujet témoin et d'un patient atteint de MA légère.** A noter un hypométabolisme sévère (régions corticales jaunes et bleues) dans le cortex associatif et limbique. Ce sont les régions cérébrales généralement impliquées qui permettent de définir le profil

FDG-PET typique de la MA. Ce profil s'aggrave lentement parallèlement aux symptômes et est bien corrélé à l'autopsie avec le diagnostic pathologique de la MA (Johnson et al., 2012).

Il est possible de détecter la charge amyloïde en TEP, par une technique appelée TEP Amyloïde. Son principe repose sur la liaison du Pittsburgh Compound B (PiB) aux plaques amyloïdes, permettant de traquer le processus d'agrégation (Ikonomovic et al., 2008) (Figure 8). Trois traceurs TEP amyloïdes ont été approuvés à la fois par la Food and Drug Administration (FDA) américaine et l'Agence européenne des médicaments (EMA) pour l'imagerie $A\beta$ chez les patients atteints de troubles cognitifs en cours d'évaluation clinique pour la MA, à savoir le [^{18}F]florbetapir (AmyvidTM) (Wong et al., 2010), le [^{18}F]flutémétamol (VizamylTM) (Nelissen et al., 2009) et le [^{18}F]florbetaben (NeuraceqTM) (Rowe et al., 2008). 96% des patients Alzheimer sont amyloïde-positifs, mais 24% des contrôles sans déficits cognitifs le sont aussi (Kemppainen et al., 2006; Roe et al., 2010). De manière réciproque, seulement une partie des patients présentant des troubles de la mémoire légers progressera vers une maladie d'Alzheimer dans les 5 à 10 ans (Petersen et al., 1999; Johnson et al., 2012). Les plaques β -amyloïdes sont détectables dans le cerveau de nombreuses années, voire des décennies avant l'apparition de la démence, mais semblent n'avoir que des effets subtils sur la cognition chez les humains (Vogel et al., 2020).

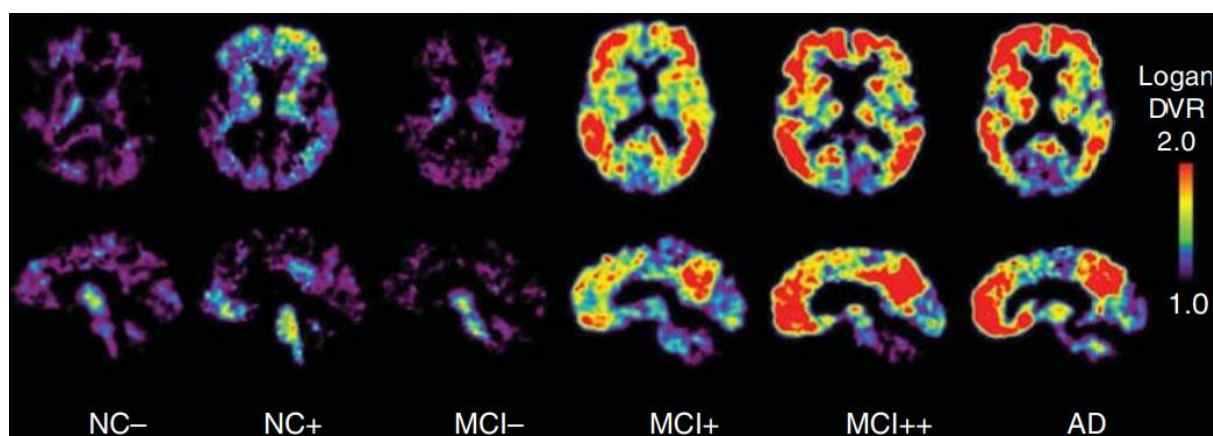


Figure 8 : Images TEP PiB de sujets témoins normaux, de patients avec un début de MA (MCI) et de patients MA montrant différents stades de dépôts d'amyloïde- β . La plupart des témoins ne montre aucun signe de dépôt d'amyloïde- β (NC-), mais une partie substantielle (25 %) en présente néanmoins un peu (NC+). La plupart des patients atteints de MCI présentent des dépôts d'amyloïde β modérés (MCI+) ou sévères (MCI++), mais jusqu'à 40 % à 50 % ne présentent aucun signe de pathologie amyloïde- β (MCI-). La grande majorité des patients atteints de MA diagnostiqués cliniquement présentent des dépôts importants d'amyloïde- β (AD) (Johnson et al., 2012).

Il a également été mis en place une imagerie TEP-Tau, qui permet d'étudier la progression de la maladie, même avant que les symptômes ne se manifestent (James et al., 2015; Saint-Aubert

et al., 2016). Le TEP-Tau permet la quantification de Tau *in vivo*, mais le signal TEP est contaminé par du signal non spécifique qui limite les interprétations. Les composés utilisés sont par exemple le flortaucipir (TauvidTM) (dérivé de structure azaindole pyridine), se lie aux filaments hélicoïdaux appariés ou PHFs). De manière importante, il a été montré que la distribution spatiale de Tau reflète mieux le phénotype clinique que A β , et que les enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau sont fortement corrélés à la neurodégénérescence locale et, à leur tour, aux troubles cognitifs (Bejanin et al., 2017). La distribution spatiale de Tau et A β est discordante, cependant l'association la plus forte peut être faite dans le cortex entorhinal (Vemuri et al., 2017). Il est également intéressant de noter que des niveaux faibles d'A β peuvent prédire le développement de la pathologie Tau dans les 5 ans dans les régions limbiques et néocorticales (Leal et al., 2018), et réciproquement un dépôt de Tau étendu se déroule en présence d'A β néocortical et est associé avec un déclin cognitif et une progression de la pathologie (Schöll et al., 2016; Pascoal et al., 2017). Une relation synergique entre les deux lésions pourrait ainsi déclencher la progression de la maladie (voir Chapitre 4. II). Les régions cérébrales successivement atteintes expliquent bien l'apparition progressive des troubles cognitifs qui caractérisent la MA : amnésie consécutive à la dégénérescence entorhinale et hippocampique ; aphasie, apraxie et agnosie avec l'atteinte du néocortex. Une étude a montré que les dépôts d'A β sont les plus élevés dans les régions appelées "default mode network", où les neurones de ce réseau sont préférentiellement actifs lorsque l'individu n'est pas concentré sur son environnement externe (Buckner et al., 2005).

D'autres marqueurs candidats ont été étudiés en relation avec l'inflammation et l'activation astrogliale dans les maladies neurodégénératives, tel que le YKL-40, une glycoprotéine synthétisée par les astrocytes et la microglie, ou la forme soluble de TREM2, qui s'est montré la plus prometteuse (Muszyński et al., 2017)

1.3.3 Les biomarqueurs plasmatiques et du liquide cébrospinal

De manière complémentaire à l'imagerie, il est également possible de quantifier plusieurs biomarqueurs présents dans le liquide cébrospinal (LCS) ou dans le plasma des patients. En France, où l'imagerie moléculaire n'est pas accessible en soin courant, ils sont bien souvent le seul outil disponible pour poser un diagnostic biologique de MA. La fiabilité des biomarqueurs a suscité leur intégration dans les critères diagnostiques de recherche de la MA dès 2007 (Dubois et al., 2007). Le triple dosage du peptide β -amyloïde (A β 1-42), de la protéine Tau totale (T-tau) et de la protéine Tau phosphorylée (P-tau) dans le LCS est un reflet sensible et

spécifique des lésions de la MA dans le parenchyme cérébral. En effet, les niveaux de Tau totale et de Tau phosphorylée détectés dans le LCS reflètent la physiopathologie liée à la MA (Blennow et al., 1995). L'explication la plus probable est que les niveaux accrus de Tau dans le LCS sont dus à une augmentation de la phosphorylation et de la sécrétion de Tau par les neurones, en tant que réponse neuronale à l'exposition à A β (Maia et al., 2013).

On peut également détecter les formes A β 1-40 et A β 1-42 du peptide A β , et les approches actuelles de détection de la MA reposent sur la classification des individus comme "positifs" ou "négatifs" pour les biomarqueurs liés à la pathologie A β . Cependant, l'accumulation d'A β commence lentement, des années avant que les biomarqueurs ne deviennent anormaux. Dans le LCS des patients Alzheimer, la concentration d'A β 1-42 est réduite de 50% par rapport au niveau basal. En effet, ce peptide s'agrège dans le parenchyme cérébral, ce qui résulte en des niveaux réduits dans le LCS. Il a été montré qu'un ratio entre la forme A β 1-42 et A β 1-40 était plus représentatif des différences inter-individuelles dans le traitement amyloïdogénique de l'APP (faibles versus forts producteurs d'A β) que la quantité d'A β 1-42 ou d'A β 1-40 seuls et permet d'appréhender cette diminution relative d'A β 1-42 (Lewczuk et al., 2017; Hansson et al., 2019). A β 1-40 étant le produit de clivage principal de l'APP, bien plus abondant que l'A β 1-42, son dosage peut être considéré comme une bonne approximation de l'A β totale. Ce ratio est, de plus, proche de 100% de concordance avec la TEP amyloïde (Mattsson et al., 2019).

Le ratio A β 1-42/A β 1-40 dans le plasma (mesuré par immunoprécipitation et spectrométrie de masse ou par ELISA hautement sensible) semble également refléter la pathologie amyloïde dans le cerveau avec une bonne précision par rapport à la TEP Amyloïde et au ratio A β 1-42/A β 1-40 dans le LCS (Janelidze et al., 2016; Nakamura et al., 2018; Schindler et al., 2019).

Dans le cerveau des patients Alzheimer, les concentrations de la protéine Tau totale (T-Tau) et Tau phosphorylée (P-Tau) sont augmentées par rapport aux témoins (Leroy et al., 2021). L'élévation de T-Tau ne survient que s'il y a une pathologie amyloïde associée (Tapiola et al., 2009). Ainsi observe-t-on dans la MA une élévation moyenne des concentrations de T-Tau et de P-Tau à 254 % et 188 % de la norme, respectivement (Olsson et al., 2016), mais seule P-Tau est un marqueur spécifique de la pathologie neurofibrillaire. La quantification de T-Tau plasmatique possède cependant une moindre spécificité que P-Tau (Zetterberg, 2017), et la corrélation avec le LCS est faible (Pereira et al., 2017). Une explication potentielle à cela est que le test mis en place est vulnérable à la dégradation protéolytique de Tau dans le sang (la demi-vie de Tau mesurée à l'aide des tests T-Tau actuellement disponibles est de 10 h)

(Zetterberg and Bendlin, 2020). L'association de ces quatre biomarqueurs peut aider à différencier une MA d'une autre maladie neurodégénérative et poser un diagnostic de MA dès le stade précoce. Leur interprétation peut se révéler difficile, liée notamment aux profils ambigus (Amyloïde+ et Tau- ou Amyloïde- et Tau+) et à la fréquence des associations pathologiques, notamment chez le sujet très âgé.

IV. Etiologie

1.4.1 La maladie d'Alzheimer d'origine génétique

Dans le cas de la MA, il existe des formes autosomiques dominantes qui sont caractérisées par un début précoce (avant 60 ans), appelées aussi formes familiales (FAD) elles représentent moins de 1% des cas; et d'autre part les formes sporadiques de la maladie, avec une survenue plus tardive mais largement plus répandues (El Kadmiri et al., 2013).

Des mutations héréditaires des gènes *APP* (amyloid- β protein precursor), localisés sur le chromosome 21 (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987) et *PSEN1* et *PSEN2* (Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995) qui codent pour les sous-unités de la γ -secrétase, la préséniline 1 (PS1) et la préséniline 2 (PS2) ont été identifiées dans les années 80 et 90. Ces mutations modifient le clivage protéolytique de l'APP et augmentent la production d'A β 1-42, le rapport A β 1-42/A β 1-40 et l'agrégation du peptide A β , ce qui aboutit finalement à l'apparition des formes familiales de la maladie d'Alzheimer (FAD) (Fernandez et al., 2014; Qiu et al., 2015). Les mutations les plus fréquentes causant les formes précoces de la MA sont retrouvées sur le gène codant pour la préséniline 1 (*PSEN1*), porté par le chromosome 14 et impliqué dans 72% des cas contre 13% de mutations sur le gène codant pour la préséniline 2 (*PSEN2*), porté par le chromosome 1 (Scheuner et al., 1996). La mutation PSEN1M139T conduit à un âge moyen de survenue de la maladie entre 39 et 51 ans (Campion et al., 1995). Les porteurs précliniques ont des niveaux relativement élevés d'A β 1-42 dans le liquide céphalo-rachidien (Portelius et al., 2012). En effet, la préséniline-1 joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du calcium et le maintien du pH lysosomal acide, les mutations associées à la FAD perturbent ainsi la fonction ATPase dépendante du calcium dans les lysosomes (Chung et al., 2019). La préséniline-2 quant à elle joue notamment un rôle crucial dans le fonctionnement mitochondrial et la bioénergétique cellulaire, notamment dans la formation et l'intégrité de la chaîne de transport d'électrons (Contino et al., 2017).

Les mutations autosomiques dominantes dans le gène *MAPT* codant pour la protéine Tau provoquent des troubles neurodégénératifs dans les modèles murins (Roberson et al., 2007; Götz and Götz, 2019), ce qui renforce l'idée du rôle causal de Tau dans les maladies neurodégénératives. *MAPT* est en effet un facteur de risque génétique de MA chez l'Homme : la duplication du gène *MAPT* provoque la formation d'enchevêtrement neurofibrillaire et le développement d'une tauopathie (Le Guennec et al., 2017).

1.4.2 L'hypothèse de la cascade amyloïde

“Our hypothesis is that deposition of amyloid β protein ($A\beta$ P), the main component of the plaques, is the causative agent of Alzheimer's pathology and that the neurofibrillary tangles, cell loss, vascular damage, and dementia follow as a direct result of this deposition”. Découlant de la découverte des mutations sur le gène de l'APP, ces mots présentent la genèse de l'hypothèse de la cascade amyloïde qui remonte à 1992 lorsque Hardy et Higgins (Hardy and Higgins, 1992) ont pour la première fois proposé que l'accumulation de peptides $A\beta$ dans le parenchyme cérébral était l'événement central de la pathogenèse de la MA. Les preuves les plus convaincantes pour appuyer cette hypothèse sont l'apparition de la pathologie chez des individus porteurs de mutations autosomiques dominantes sur les gènes codant pour la protéine précurseur amyloïde (APP) ou les protéines du complexe γ -secrétase préséniline 1/2 (PSEN1/2). L'hypothèse de la cascade amyloïde a reçu un soutien supplémentaire depuis la génération d'une variété de modèles de souris transgéniques APP ou APP/PS1 qui se sont avérés récapituler certaines des principales caractéristiques anatomopathologiques et comportementales de la forme familiale de la MA, telles que la formation des plaques amyloïdes, la perte synaptique, des altérations de la plasticité synaptique et troubles de la mémoire (Puzzo et al., 2014). Dans cette hypothèse, la mutation des gènes impliqués dans la biosynthèse, l'agrégation et la dégradation d' $A\beta$ entraîne un déséquilibre entre la production d' $A\beta$ et la clairance d' $A\beta$, conduisant à l'accumulation anormale d' $A\beta$ dans le cerveau. (Mawuenyega et al., 2010)

Depuis plusieurs années, un nombre croissant d'arguments s'est élevé contre cette théorie fondatrice, comme le fait que la grande majorité des cas de MA sont sporadiques et, bien qu'ils présentent également des plaques $A\beta$ et des enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau, il n'est pas si simple de conclure que MA d'origine génétique et sporadique partagent le même déclencheur pathogène (Ricciarelli and Fedele, 2017). Il a été constamment démontré que l'accumulation et le dépôt d' $A\beta$ ne sont pas corrélés avec la perte neuronale et le déclin cognitif,

et que de nombreuses personnes ont une charge importante de plaques amyloïdes, évaluée par TEP, sans montrer de symptômes de troubles de la mémoire (Aizenstein et al., 2008). L'hypothèse amyloïde a été modifiée pour incarner le concept selon lequel les oligomères d'Aβ solubles, plutôt que leurs agrégats fibrillaires insolubles, sont les espèces toxiques et qu'ils sont présents avant que les peptides Aβ ne soient agrégés et déposés sous forme de plaques amyloïdes dans le cerveau. Dans ce scénario, ces oligomères toxiques dérivés de l'APP sont les principaux responsables des dysfonctionnements synaptiques (Voir Chapitre 3, partie 2b) et sont responsables de l'initiation de déficits cognitifs avant que les lésions caractéristiques ne se manifestent dans le cerveau (Mucke and Selkoe, 2012; Ferreira et al., 2015; Nhan et al., 2015). Bien que cette hypothèse postule que l'agrégation Aβ est l'événement pathologique initiateur de la MA, les études de biomarqueurs et de pathologie ont montré une forte corrélation entre l'accumulation d'enchevêtrements neurofibrillaires et la neurodégénérescence et le déclin cognitif, alors que la pathologie amyloïde n'était que faiblement corrélée avec la progression de la MA (Herrup, 2015). Plusieurs études ont ainsi apporté des preuves convaincantes que Aβ n'était pas la seule protéine responsable dans le tableau clinique de la MA, mais plutôt qu'il existerait une synergie avec la protéine Tau (voir Chapitre 4 partie 2). Sur la base de ces résultats, il a été postulé que, dans la cascade pathologique de la MA, "Aβ est le déclencheur et Tau est la balle" (Bloom, 2014).

Si certaines mutations sur le gène *APP* sont responsables du déclenchement de la MA et d'autres sont protectrices, l'hypothèse de la cascade amyloïde demeure possible, tout en n'excluant pas d'autres hypothèses comme l'implication de facteurs environnementaux ou de facteurs génétiques touchant d'autres gènes que l'*APP*.

1.4.3 La forme sporadique et les autres facteurs de risque liés à la MA

Bien qu'elles ne soient pas identiques, la FAD à début précoce et la maladie d'Alzheimer sporadique à début tardif présentent un large chevauchement clinique et pathologique (Frisoni et al., 2007) et peuvent donc partager des mécanismes communs de dysfonctionnement cognitif dépendant de l'Aβ (Figure 9).

La majorité des cas de MA sont des formes sporadiques, pour lesquelles plusieurs facteurs de risque ont été mis en évidence : le principal étant l'âge, avec une incidence qui double par tranche de cinq ans après 65 ans (Rademakers et al., 2003). Des facteurs de risque génétique ont ainsi été identifiés, tel que l'allèle ε4 du gène codant pour l'apolipoprotéine E (*ApoE*). Ce

gène est présent sous trois formes alléliques dans la population générale ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) codant pour trois isoformes protéiques E2, E3 et E4 respectivement. L'association de l'allèle APOE $\epsilon 4$ avec le risque de MA a été maintes fois démontrée (Farrer et al., 1997; Mahley et al., 2006), alors que l'allèle $\epsilon 2$ est associé à un effet protecteur (Kim et al., 2009). APOE régule le transport du cholestérol et des lipides, et est impliqué dans la réponse des neurones suite à des dommages. Les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* ont un risque 2 à 3 fois plus élevé avec un seul allèle et 12 à 15 fois plus de risques pour les porteurs de deux allèles de développer la maladie d'Alzheimer. Bien que cette population présente un risque, la présence de l'allèle $\epsilon 4$ n'est pas nécessaire ni suffisante pour développer la MA. La présence spécifique d'APOE dans les plaques (dans la partie la plus centrale) associée aux neurites dystrophiques chez les patients MA suggère que l'APOE peut contribuer à l'agrégation du peptide A β , améliorant la capacité de certaines plaques à endommager les axones environnants (Dickson et al., 1997). Tau a également des relations bidirectionnelles avec ApoE4. Cet allèle favorise l'hyperphosphorylation de la Tau endogène dans les neurones humains dérivés des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et chez les souris transgéniques (Tesseur et al., 2000; Brecht et al., 2004; Wang et al., 2018). A l'inverse, une suppression de la Tau endogène protège les souris transgéniques exprimant des fragments d'ApoE4 humaine contre le déclin cognitif (Andrews-Zwilling et al., 2010), ce qui suggère une interdépendance mutuelle entre ces facteurs pathogènes. Récemment, il a été mis en évidence un autre facteur génétique à risque dans la maladie d'Alzheimer sporadique : *TREM2*, qui code pour un récepteur de surface cellulaire exprimé par la microglie, suscite en effet un vif intérêt car son variant R47H confère un risque de développer la MA comparable à l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* (Vautheny et al., 2021).

La clairance défectueuse d'A β (et de Tau) est considérée comme sous-jacente à la majorité des cas sporadiques de la MA. Des études suggèrent que certains facteurs de risque génétiques contribuent au développement et à la progression de la MA en modulant la clairance des protéines pathologiques. Ainsi, via des études d'association pangénomique d'autres gènes ont pu être identifiés comme facteurs de risques répartis principalement dans trois voies : l'endocytose et la voie endo-lysosomale (*PICALM*, *BIN1*, *SORL1*), le transport de l'APP (*PLD3*) ou le métabolisme lipidique (*SORL1*, *CLU*) (Harold et al., 2009; Reitz and Mayeux, 2014). En effet, le gène codant pour l'amphiphysine 2 (également connu sous le nom de BIN1) est le deuxième locus de risque le plus répandu pour l'AD à début tardif (Seshadri et al., 2010).

Dans les formes monogéniques de la MA, A β serait toujours responsable de la pathogenèse, alors que dans les formes sporadiques, A β ne serait qu'un accélérateur important du processus

pathologique. La MA sporadique semble donc être caractérisée par une interaction plus complexe entre le vieillissement, l'agrégation A β , les modifications vasculaires, l'inflammation, le stress oxydant et d'autres co pathologies, comme l' α -synucléine neuronale et des inclusions TDP-43 (Zetterberg and Bendlin, 2020). Environ 50 % des personnes atteintes de la MA ont une pathologie α -synucléine dans le cerveau en plus de la pathologie caractéristique A β et Tau (Hamilton, 2000).

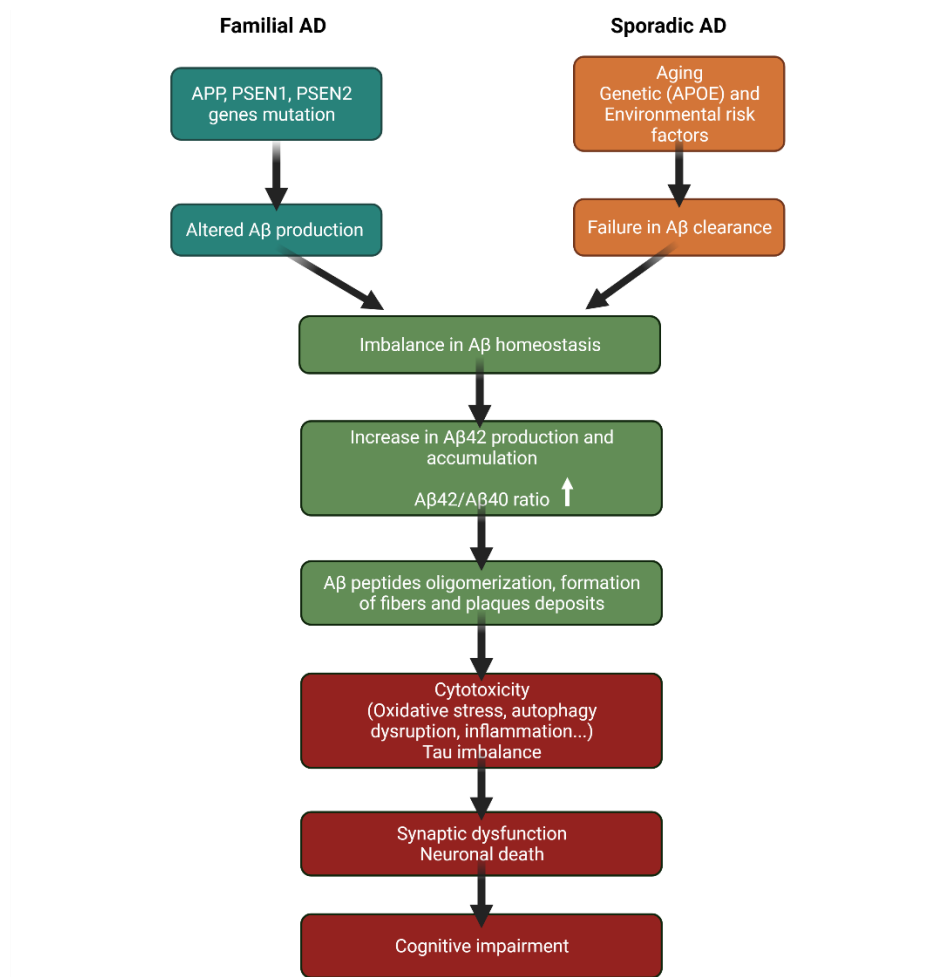


Figure 9 : La MA d'origine familiale et la MA d'origine sporadique et leurs causes sous-jacentes. Les origines de ces deux variantes de la MA sont différentes : une/des mutations génétiques pour la MA d'origine familiale et pour la MA sporadique plutôt des dysfonctionnements liés à l'âge, des facteurs de risques environnementaux ou encore des mutations génétiques à risque comme APOE. Ces causes vont mener ultimement à une dérégulation de l'homéostasie d'A β , entraînant une mort neuronale importante. Adapté de Qiu et al., 2015.

Il est important de souligner que les symptômes n'apparaissent qu'à un âge et un stade avancé de la maladie, ce qui implique l'existence d'un système tampon qui empêche l'apparition de la maladie et la formation d'amyloïde plus tôt dans la vie (Labbadia and Morimoto, 2015). La

phase clinique de la maladie est initiée lorsque la réaction cellulaire ne peut plus maintenir l'homéostasie (De Strooper and Karran, 2016). Par exemple, l'augmentation de certaines enzymes dégradant l'A β peut initialement compenser le déclin de l'activité d'autres enzymes, mais au fur et à mesure du vieillissement, les facteurs génétiques et les maladies telles que l'hypertension et le diabète diminuent l'efficacité d'autres voies d'élimination de l'A β , la réduction de la clairance du peptide A β augmente alors les niveaux de ce peptide dans le cerveau conduisant au développement de la MA (Miners et al., 2008).

Ainsi le dysfonctionnement métabolique est l'une des premières caractéristiques pathologiques de la MA. La MA est souvent appelée diabète de type 3 en raison de la présence d'une résistance à l'insuline qui se développe dans le cerveau au cours de la maladie (Vinuesa et al., 2021). Ces facteurs de risques vasculaires, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle sont associés à une augmentation du risque de déclin cognitif (Alagiakrishnan et al., 2006). Une prévalence plus élevée de l'obésité a également été observée en corrélation avec la MA. En plus des facteurs mentionnés précédemment, il existe des preuves que les facteurs de risque environnementaux, tels que les métaux lourds toxiques, des pesticides ou la qualité de l'air peuvent également contribuer au développement de la MA (Killin et al., 2016). À l'inverse, une consommation modérée d'alcool, un régime alimentaire de type méditerranéen, la pratique d'une activité physique régulière et en particulier un niveau d'éducation élevé (en lien avec la Réserve cognitive) pourraient avoir un effet protecteur (Satizabal et al., 2016).

Les espèces A β solubles peuvent se lier à divers récepteurs cellulaires neuronaux et transduire des signaux neurotoxiques provoquant des défauts cellulaires qui incluent le stress oxydatif et une dérégulation transcriptionnelle à médiation épigénétique (Karisetty et al., 2020). L'épigénétique signifie ce qui contrôle l'organisme au-delà de la génétique, ou les mécanismes régulant l'expression des gènes qui n'impliquent pas de changements dans le génotype. À l'heure actuelle, il est très clair que toutes les caractéristiques d'un individu ne sont pas déterminées uniquement par l'ADN, mais que le mode de vie, l'environnement, le stress, et la nutrition jouent un rôle essentiel dans la détermination de la réponse d'un organisme et conduisent à cette diversité phénotypique quant à la susceptibilité aux maladies neurodégénératives (Chin-Chan et al., 2015). Les mécanismes épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'ARN non codant qui ont un impact substantiel sur la progression et les voies liées à la maladie d'Alzheimer. Les mécanismes épigénétiques sont dérégulés dans la maladie d'Alzheimer et se caractérisent par une hyperméthylation de l'ADN, une désacétylation des histones et un état général réprimé de la chromatine qui modifie l'expression des gènes

(Lardenoije et al., 2015; Sharma et al., 2020). Les modifications de l'acétylation sont médiées par les histones acétyltransférases (HAT) et les désacétylases (HDAC), et l'équilibre de ces enzymes régule l'homéostasie neuronale (Schneider et al., 2013). La HDAC1 est diminuée chez les personnes atteints de la MA, ce qui serait la preuve de dysfonctionnements de l'acétylation au niveau des enzymes associées et des histones dans les cerveaux des patients (Schueller et al., 2020).

Chapitre 2 : La protéine Tau associée aux microtubules

I. Génétique et structure

2.1.1 Génétique de la protéine Tau

La protéine Tau fait partie de la famille des MAPs (pour Microtubule Associated Proteins), c'est une protéine stabilisatrice des microtubules majoritairement synthétisée au niveau neuronal (Binder et al., 1985). Chez l'Homme, elle est codée par le gène *MAPT* (Microtubule-Associated Protein Tau), long de 134 kb et localisé sur le chromosome 17 au locus 17q21.31 (Neve et al., 1986). L'expression de *MAPT* est régulée par un promoteur localisé autour de l'exon -1 ou 0 même si la littérature suggère l'existence de près de 6 autres promoteurs dans la séquence de *MAPT* (Caillet-Boudin et al., 2015). La séquence du gène *MAPT* possède 15 exons numérotés de 0 à 13, certains d'entre eux étant non codants (Figure 10). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont des exons constitutifs. L'exon 14 fait partie de la région 3' non traduite de l'ARNm de Tau (Buée et al., 2000). Ainsi, Tau peut subir un épissage alternatif principalement sur les exons 2, 3, 4a, 6 et 10. Les mécanismes de régulation de cet épissage ont été extensivement étudiés (Wei and Andreadis, 2002; Andreadis, 2005; Caillet-Boudin et al., 2015). Les exons 2, 3 et 10 sont épissés alternativement et sont spécifiques au cerveau adulte, donnant 6 isoformes différentes. Ces derniers ont 0, 1 ou 2 inserts N-terminaux et sont nommés 0N si aucun des exons 2 et 3 n'est inclus, 1N si seulement l'exon 2 est présent ou 2N si les exons 2 et 3 sont présents simultanément. L'exon 3 n'est jamais inclus indépendamment de l'exon 2. De plus, les isoformes peuvent avoir trois répétitions de liaison aux microtubules (3R) ou quatre (4R) et cela est régulé par l'épissage ou non de l'exon 10. La plus petite isoforme (c'est-à-dire Tau 0N3R) est présente aux premiers stades du développement tandis que les six isoformes sont présentes à l'âge adulte avec un rapport 1:1 3R/4R (Andréadis, 2005). L'inclusion de l'exon 4a

donne une isoforme plus longue exclusivement présente dans un système nerveux périphérique (SNP) (Goedert et al., 1992). Enfin, l'exon 6 peut être présent dans le SNC fœtal et adulte et d'autres tissus (Luo et al., 2004).

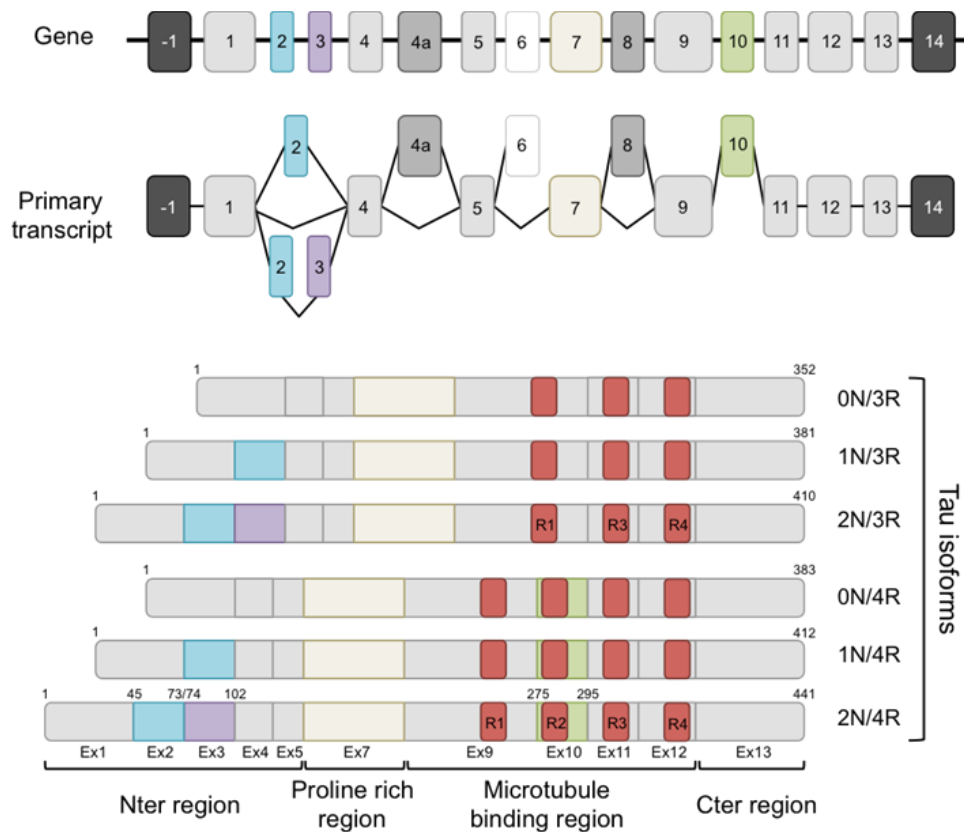


Figure 10 : **Du gène MAPT à la protéine Tau.** La structure du gène MAPT, l'épissage alternatif et les différentes isoformes de la protéine Tau présentes au sein du système nerveux central humain. Le gène MAPT contient 16 exons, l'exon -1 faisant partie du promoteur. Le transcrit primaire tau contient 13 exons. Les exons -1 et 14 sont transcrits mais pas traduits. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13 sont constitutifs, et les exons 2, 3 et 10 sont épissés alternativement, donnant lieu à six ARNm différents, traduits en six isoformes de Tau différentes dans le SNC. Ces isoformes diffèrent par l'absence ou la présence d'un ou deux inserts N-terminaux de 29 acides aminés codés par l'exon 2 (en bleu) et 3 (en mauve), associés avec trois (R1, R3 et R4) ou quatre (R1, R2, R3 et R4) répétitions (en rouge). Le domaine de liaison aux microtubules est codé par l'exon 10 (en vert), suivie du domaine de projection en C-terminal. Dans le cerveau adulte, Tau comprend les six isoformes, y compris la plus grande isoforme de 441 acides aminés contenant tous les inserts et l'isoforme la plus courte de 352 acides aminés qui est la seule que l'on trouve uniquement chez le fœtus. Figure modifiée d'après Luna-Munoz et al., 2013.

2.1.2 Structuration de la protéine Tau

La protéine Tau est composée de quatre domaines structuellement et fonctionnellement distincts (Buée et al., 2000) :

- Le domaine N-terminal est porté par les exons 1 à 5, et est variable en fonction de l'inclusion des exons 2 et 3 lors de l'épissage alternatif. Il régule la liaison de la protéine Tau aux microtubules et détermine l'espacement entre ceux-ci (Chen et al., 1992; Derisbourg et al., 2015). La région N-terminale associée au domaine riche en proline est appelée "domaine de projection".
- Le domaine central riche en proline, codé par l'exon 7. Cette région riche en proline est impliquée dans la signalisation cellulaire, se liant à l'actine et à la tubuline (He et al., 2009; Arendt et al., 2016).
- Le domaine de liaison aux microtubules (MTBD) codé par les exons 9 à 12, qui permet à Tau de se lier aux microtubules. La présence de trois ou quatre répétitions contrôlées par l'épissage de l'exon 10 contrôle l'affinité pour les microtubules (Mandelkow et al., 1995).
- Le domaine de projection C-terminal où plusieurs sites de phosphorylation sont présents (Šimić et al., 2016). Ce domaine contribue également à la liaison de Tau à la tubuline et régule la liaison de Tau à la membrane plasmique (Arendt et al., 2016; Kadavath et al., 2018).

Tau appartient à un groupe de protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs), elle n'a pas de structure secondaire stable en solution (Jeganathan et al., 2008). Au lieu de cela, la protéine Tau peut adopter rapidement plusieurs conformations lors de l'interaction avec différents partenaires de liaison (Merezhko et al., 2020).

II. Multiples fonctions de la protéine Tau

2.2.1 Tau et les microtubules

La fonction canonique de Tau est de stabiliser et maintenir l'intégrité des microtubules et par extension le cytosquelette du neurone. Depuis la découverte de Weingarten et al qui ont montré la capacité de Tau à former et stabiliser la tubuline *in vitro* (Weingarten et al., 1975), plusieurs études sont venues confirmer cette observation *in vitro* et *in vivo* (Scott et al., 1992; Samsonov et al., 2004). Dans le neurone polarisé, la protéine Tau est majoritairement localisée dans le compartiment axonal, mais Tau a aussi été retrouvée dans le noyau, la membrane plasmique, les mitochondries, le réticulum endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi (Farah et al., 2006). Dans des conditions normales, la protéine Tau est constamment phosphorylée et

déphosphorylée pour réguler l'assemblage des microtubules dans les axones. L'interaction dynamique entre Tau et les microtubules régule de multiples fonctions neuronales, y compris la polarité et la stabilité des neurites, la croissance, le guidage des axones et l'organisation des faisceaux de microtubules qui constituent l'axone (Caceres and Kosik, 1990; Brandt and Lee, 1993; Esmaeli-Azad et al., 1994; Kempf et al., 1996; Takei et al., 2000; Biswas and Kalil, 2018; Tapia-Rojas et al., 2019). Tau est également impliquée dans la facilitation du transport axonal rétrograde et antérograde des cargos cellulaires en régulant l'activité des protéines motrices telle que la dynéine et la kinésine (Dixit et al., 2008). Dans les neurones sains, une concentration plus faible de Tau dans le soma permet la liaison de la kinésine aux microtubules et le transport antérograde des cargaisons vers l'axone distal. Les cargos sont ensuite libérés en raison de la concentration plus élevée de Tau au niveau de l'axone distal, alors que le transport rétrograde dépendant de la dynéine de l'axone au soma n'est pas affecté du fait de la sensibilité plus faible de la dynéine à Tau. Cependant, le transport axonal Tau-dépendant est controversé car il n'a pas encore été validé par des études *in vivo*. Une étude montre même que la surexpression ou le knock-out (KO) du gène codant pour la protéine Tau dans un modèle murin ne produit pas d'altération du transport axonal (Yuan et al., 2008).

2.2.2 Fonctions atypiques de la protéine Tau

De nouvelles études ont montré dans des modèles expérimentaux de souris Tau-KO qu'une perte de fonction de Tau pouvait induire des déficiences synaptiques, des perturbations des voies de signalisation intracellulaires, une augmentation du stress oxydatif, de l'inflammation, des dysfonctionnements du métabolisme des ARN ou encore des dommages à l'ADN (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014; Mansuroglu et al., 2016; Lebouvier et al., 2017; Marciniak et al., 2017; Sotiropoulos et al., 2017). Ensemble, ces observations ont conduit les chercheurs à postuler que Tau est une protéine pléiotrope avec plusieurs rôles au sein de l'organisme. Dans ce contexte, la notion de protéine associée aux microtubules dans les neurones est dépassée et Tau devient progressivement une protéine régulant de nombreuses fonctions dans plusieurs tissus.

Les ARNm de Tau se retrouvent dans les reins, le cœur et les muscles squelettiques, les ovaires, le pancréas, la peau, ou encore les testicules. Dans des conditions physiologiques, les niveaux de Tau endogène dans les oligodendrocytes sont faibles (LoPresti et al., 1995) et quasiment aucune Tau endogène n'a été retrouvée dans les astrocytes et la microglie (Ilschner and Brandt, 1996; Müller et al., 1997). Des études récentes montrent que Tau est fortement associée à

l'homéostasie du glucose par la voie de l'insuline dans les neurones de l'hippocampe (Gratuze and Planel, 2017; Marciniak et al., 2017). De plus, Tau a été retrouvée dans le pancréas au niveau des îlots de Langerhans où elle régulerait également l'homéostasie du glucose (Wijesekara et al., 2018). Ceci est cohérent avec le fait que les modèles de souris Tau-KO présentent systématiquement un phénotype de troubles métaboliques (Yarchoan et al., 2014). En outre, Sigala et al ont démontré un autre rôle de la protéine Tau dans le sperme humain et le tissu testiculaire, dans lequel elle participerait au développement des spermatozoïdes et aurait donc un rôle dans la fertilité (Sigala et al., 2014). Des preuves grandissantes suggèrent que la protéine Tau aide également à réguler plusieurs voies de signalisation. Des travaux ont défini la voie PI3K/Akt comme une voie principale de survie et de croissance cellulaires dans le cancer, et Tau s'est avéré être un régulateur négatif de la signalisation de l'insuline via la voie PI3K/Akt (Marciniak et al., 2017). Tau suractive la voie PI3K/Akt qui est alors constitutivement activée. Étant donné que la suractivation de cette voie a été étroitement liée à l'inhibition de l'apoptose et de la croissance cellulaire dans les cancers, il est très probable que Tau participe à la progression du cancer par cette voie. De même, Tau semble être un régulateur clé des voies ERK/MAPK et p38/MAPK (Drubin et al., 1985). Ces deux voies favorisent la croissance cellulaire en augmentant la prolifération cellulaire et en diminuant la mort cellulaire.

Tau a également la capacité de se lier à l'ADN *in vitro* (Villasante et al., 1981). Ceci est concordant avec l'étude de Loomis et al montrant que Tau est présent dans le compartiment nucléaire (Loomis et al., 1990). Depuis, plusieurs études ont montré des interactions entre Tau et les acides nucléiques (Galas et al., 2019). Tau peut s'associer à l'ADNdb *in vitro* et est capable de le protéger de la dénaturation dans des conditions hyperthermiques (Hua et al., 2003). Lu et al ont confirmé l'hypothèse selon laquelle Tau est capable de protéger l'ADN de différentes menaces et ont précisé que cela était spécifique à la Tau non phosphorylée (Lu et al., 2013b). Ces observations ont conduit à une hypothèse intéressante : Tau est internalisée dans le noyau afin de protéger l'ADN contre des menaces diverses en conditions physiologiques et pathologiques. Cette hypothèse est basée à la fois sur des expériences *in vitro* et des observations *in vivo* dans des cerveaux humains atteints de la MA, montrant que la pathologie Tau était associée à une augmentation des cassures de l'ADN double-brin (Violet et al., 2014, 2015). En 2011, Sultan et al ont démontré que l'induction d'un stress hyperthermique dans les neurones, mimant les effets du stress oxydatif observé dans les tauopathies, entraînait une accumulation nucléaire rapide et réversible de Tau (Sultan et al., 2011). De plus, les cassures de l'ADN double-brin étaient considérablement diminuées lorsque Tau était retrouvée dans le

noyau et cela accompagné d'une meilleure survie cellulaire, offrant ainsi une protection globale de l'ADN. Violet et ses collègues ont confirmé cette implication de Tau dans la protection de l'ADN *in vivo* dans des modèles de souris Tau-KO (Violet et al., 2014). Pris ensemble, ces travaux ont permis d'attribuer un important rôle à Tau dans la protection de l'ADN.

Des études ont montré que Tau peut être présente dans le compartiment mitochondrial et régule les fonctions mitochondriales (Hu et al., 2016b; Cieri et al., 2018). Au cours de la neurodégénérescence, un dysfonctionnement mitochondrial est presque toujours observé. En particulier, les tauopathies présentent de nombreuses altérations de la forme des mitochondries, de leur métabolisme et de leur localisation axonale. En accord avec ce postulat, plusieurs études ont montrées que Tau influençait le mouvement des mitochondries vers la périphérie nucléaire par le biais d'un mécanisme dépendant des microtubules (Stamer et al., 2002; Li et al., 2016). En parallèle, une oxydation des protéines, une peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif sont observés (Wang et al., 2014; Cabezas-Opazo et al., 2015; Abolhassani et al., 2017). Ces études ont lié la forme pathologique de Tau à une distribution anormale des mitochondries à travers les axones, un dysfonctionnement dans le cycle de fusion/fission, une mitophagie altérée ou encore un potentiel membranaire mitochondrial altéré (Cheng and Bai, 2018; Zheng et al., 2020). Même s'il est largement suggéré que de telles altérations se produisent parce que la Tau pathologique est toxique pour les cellules, cela se produit également en raison de la perte de fonction de la Tau endogène. De plus, une étude a mis en évidence une régulation étroite de l'interaction mitochondrie-réticulum endoplasmique et des échanges de calcium médiés par la protéine Tau. Les auteurs expliquent que cette régulation limite le stress oxydatif et l'apoptose (Cieri et al., 2018). Par conséquent, Tau pourrait être une protéine qui apporte une stabilité génomique agissant en amont des dommages avec un rôle dans la protection de l'ADN (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014), mais aussi en aval par la prévention du stress oxydatif (Frost et al., 2014).

En résumé, en plus de ses fonctions de MAP, Tau contribue à la protection des acides nucléiques (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014), à la régulation de certaines voies de signalisation cellulaire (Leugers et al., 2013; Marciniak et al., 2017; Perea et al., 2018), à la prévention du stress cellulaire (Violet et al., 2015; Cieri et al., 2018) et bien davantage, car il reste de multiples fonctions de Tau encore non élucidées (Chang et al., 2021).

III. Modifications post-traductionnelles de la protéine Tau et implications des kinases/phosphatases

2.3.1 Sites de phosphorylation et phosphorylations pathologiques

Dans des conditions physiologiques et pathologiques, Tau peut subir différentes modifications post-traductionnelles : phosphorylation, ubiquitination, troncature, glycation, glycosylation, nitration et sumoylation. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont composés de Tau agrégée qui porte des modifications post-traductionnelles anormales, parmi elles l'hyperphosphorylation est la plus représentée. Tau possède au total 85 sites de phosphorylation possibles (45 résidus sérine, 35 thréonine et 5 tyrosine) sur les 441 acides aminés qui composent l'isoforme la plus longue exprimée dans le cerveau (758 sinon dans les tissus périphériques), la plupart de ces sites se trouvant dans le domaine de liaison aux microtubules (Figure 11).

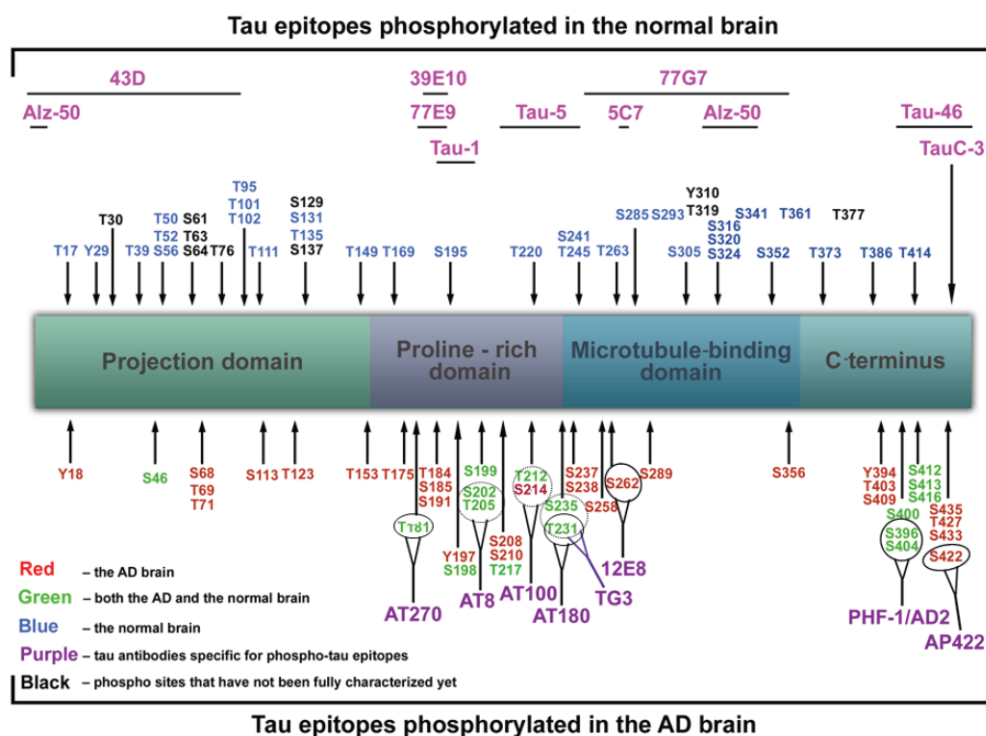


Figure 11: **Représentation des différents domaines composants la protéine Tau ainsi que les sites de phosphorylation potentiels physiologiques et pathologiques présents sur chaque domaine.** En rouge les sites phosphorylés dans le cerveau des patients atteints de MA, en bleu les sites phosphorylés dans un cerveau sain et en vert les sites potentiellement phosphorylés dans les deux situations. En violet sont décrits les dénominations des anticorps reconnaissant les épitopes associés (Šimić et al., 2016).

Certains de ces sites potentiels de phosphorylation comme la Ser262 et la Ser396 diminuent fortement les interactions entre Tau et les microtubules (Morris et al, 2015), ou d'autres comme

Ser202/Thr205/Ser208 promeuvent l'agrégation de Tau (Despres et al., 2017). Les modifications de Tau, la déstabilisation des microtubules, ainsi que les perturbations du transport axonal sont associées à une perte synaptique importante (Takashima, 2006).

La phosphorylation de la protéine Tau régule ainsi finement ses activités, en contrôlant en particulier sa liaison avec les microtubules. Lorsqu'elle est hyperphosphorylée à un certain degré, la Tau agrégée se désolidarise des microtubules. Elle régule ainsi la dynamique microtubulaire et le transport axonal : une phosphorylation élevée de la protéine Tau diminue son affinité pour les microtubules et augmente le nombre de protéines Tau libres, sans affecter la cinétique du transport axonal. Une réduction de la phosphorylation de Tau augmente l'affinité de Tau pour les microtubules mais inhibe le transport axonal de Tau (Rodríguez-Martín et al., 2013). Les modifications post-traductionnelles influencent la stabilité intra et extracellulaire de la protéine Tau : la Tau hyperphosphorylée ayant une plus faible affinité pour les microtubules, elle a alors des risques d'interagir à des localisations ectopiques, comme dans les épines dendritiques où la Tau hyperphosphorylée perturbe le fonctionnement synaptique (Hoover et al., 2010). Cette hyperphosphorylation est due à un déséquilibre entre la régulation des kinases et des phosphatases (Gao et al., 2018).

2.3.2 Les kinases et phosphatases de la protéine Tau

Cet équilibre entre kinases et phosphatases, qui respectivement phosphorylent et déphosphorylent la protéine Tau, est capital dans la dynamique et le bon fonctionnement du neurone.

Il existe 4 groupes de kinases interagissant avec la protéine Tau (Sergeant et al., 2008) :

- Les protéines kinases Proline-spécifiques (Proline-directed protein kinases, PDPK), qui phosphorylent Tau sur des sérines ou des thréonines qui sont suivies par un résidu proline, comme la famille des CDK (CDK1, CDK5...)(Michel et al., 1998);
- Le groupe non-PDPK, qui inclue la Tau tubulin kinase 1, Caséine kinase 1 and 2, PKA, PKB/AKT et PKC (Singh et al., 1995; Schneider et al., 1999; Fang et al., 2000), mais aussi la MAP (mitogen-associated protein), Ca/Kinase II dépendante de la calmoduline, MARK et JNK (c-jun NH2-terminal kinase) (Drewes et al., 1992; Sironi et al., 1998; Schneider et al., 1999; Reynolds et al., 2000) et DYRK (Woods et al., 2001);
- Les protéines kinases Tyrosine, comme les kinases Src;

- Les kinases qui phosphorylent Tau sur des résidus sérine ou thréonine parfois, mais pas toujours, suivi par un résidu proline, comme la Glycogène synthase kinase 3 (GSK-3).

Phosphorylation de Tau

Parmi les protéines kinases qui ont été impliquées dans la phosphorylation de la protéine Tau figure la Glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) (Ishiguro et al., 1993). La Glycogène synthase kinase 3 est une sérine/thréonine kinase constitutivement active, qui est impliquée dans le métabolisme du glycogène mais également dans la division cellulaire, le renouvellement des cellules souches, l'apoptose (mort cellulaire programmée), la différenciation cellulaire, le rythme circadien, la transcription de certains gènes et la régulation de l'insuline. Il existe trois isozymes de GSK-3, à savoir GSK-3 α , GSK-3 β et GSK-3 δ . Chez l'Homme, GSK-3 est codée par deux gènes qui sont situés sur 19q13.2 et 3q13.3. La GSK-3 est abondamment retrouvée dans le SNC, en particulier dans l'hippocampe (Hooper et al., 2008). La GSK-3 est régulée par des modifications post-traductionnelles, c'est-à-dire la phosphorylation de Ser9 (inhibitrice) et Tyr216 (activatrice) pour GSK-3 β . Dans la MA, la suractivité de GSK-3 β est responsable d'une hyperphosphorylation de Tau, d'une augmentation de la production de peptide A β , de réponses inflammatoires associées à la microglie et de troubles de la mémoire. La phosphorylation de Tau par la GSK-3 β régule finement la liaison de Tau aux microtubules, sa dégradation et son agrégation (Hanger et al., 1992; Mandelkow et al., 1992; Lovestone et al., 1994; Sperber et al., 1995; Hurtado et al., 2012).

Une seconde kinase est importante dans la phosphorylation de Tau. En effet, il a été montré que CDK5 est capable de phosphoryler Tau sur les Ser202, Ser235, Ser396, Ser404 et sur les Thr205, Thr212 et Thr217 (Lee and Tsai, 2003). Il a été rapporté que l'activation de CDK5 par p25, une forme tronquée de p35, favorise la phosphorylation et l'agrégation de Tau (Cruz et al., 2003; Noble et al., 2003) et que p25 s'accumule dans le cerveau des patients atteints de MA (Patrick et al., 1999) et chez les souris APP (Otth et al., 2002).

DYRK1A est également connue pour réguler l'épissage de Tau et phosphoryler cette dernière sur plusieurs sites, notamment Thr181, Thr212 et Thr231, qui sont tous retrouvés dans les enchevêtrements neurofibrillaires présents dans les cerveaux atteints de MA (Souchet et al., 2019).

Déphosphorylation de Tau

La déphosphorylation de la protéine Tau est assurée par des phosphatases, la principale étant PP2A. Les phosphatases à localisation cytoplasmique sont classées en quatre types, à savoir PP1 (protéine phosphatase 1), PP2A, PP2B et PP2C (Götz, 2001). La "famille PP2A" englobe les enzymes multimères, l'holoenzyme mammifère typique étant composée d'une sous-unité "C" catalytique (PP2Ac) associée à une sous-unité "A" d'échafaudage et à une sous-unité "B" régulatrice variable (Taleski et al., 2021a). Une diminution de l'activité de PP2A entraîne une hyperphosphorylation anormale de Tau non seulement par une diminution de la déphosphorylation de Tau mais également en stimulant les activités des kinases de Tau comme les kinases CaMKII, PKA et MAP qui sont régulées par PP2A (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2005). Dans le cerveau de patients atteints de la MA, l'activité de PP2A est diminuée (Gong et al., 1993, 1994). L'analyse *in vitro* de la capacité de déphosphorylation de différentes phosphatases vis-à-vis de Tau a montré que PP2A contribuait à 71 % de la déphosphorylation de la Tau hyperphosphorylée humaine isolée du cerveau de patients atteints de MA (Liu et al., 2005). Une autre étude a montré que Pin1 peut faciliter la déphosphorylation de Tau par PP2A sur la pThr231 (Galas et al., 2006; Wang et al., 2007b). La PP2Ac peut être méthylée sur son résidu leucine 309 par la Leucine carboxyl méthyl transférase (LCMT1), et cette méthylation multiplie l'activité phosphatase de la PP2A par deux (Favre et al., 1994; De Baere et al., 1999). Inversement, la protéine Phosphatase méthyl estérase (PME-1) déméthyle PP2Ac et diminue son activité (Lee et al., 1996; Ogris et al., 1999)(Lee, 1996 ; Ogris, 1999). Dans la MA, méthyl-PP2A est réduite tandis que déméthyl-PP2A est augmentée, ce qui entraîne une réduction du rapport méthyl/déméthyl PP2A de 75 % par rapport aux témoins (Park et al., 2018).

2.3.3 Autres modifications post-traductionnelles de la protéine Tau

Des modifications post-traductionnelles anormales, telles que la troncature, sont probablement impliquées dans le processus pathologique de la MA. De nombreux tests cellulaires montrent que la troncature de la partie C-terminale de Tau ou des parties N- et C-terminales a un impact sur ses propriétés biochimiques et fonctionnelles et déclenche un gain de fonction toxique. Les espèces générées par ces clivages se retrouvent dans les enchevêtrements neurofibrillaires, et leur apparition est corrélée à la gravité de la maladie (Derisbourg et al., 2015). La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle moins connue de Tau qui implique l'ajout de N-acétylglucosamine sur les résidus sérine et thréonine. Il a été démontré que

l'inhibition de la O-GlcNAcase (OGA) réduit la pathologie Tau dans plusieurs modèles transgéniques (Hastings et al., 2017). Dans les cerveaux atteints de MA, la N-glycosylation s'est avérée augmentée, tandis que la O-GlcNAcylation semble être réduite, ce qui peut expliquer les phénomènes globaux d'hyperphosphorylation et d'agrégation observés dans la pathologie. La dégradation de Tau (via l'autophagie ou via le protéasome) et sa troncature par les protéases peuvent également être altérées par phosphorylation. D'autres modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitination et la SUMOylation, pourraient influencer la dégradation de Tau à travers le protéasome, directement ou indirectement, respectivement (Babu et al., 2005; Luo et al., 2014).

2.3.4 Les modifications post-traductionnelles et la dégénérescence neurofibrillaire

Dans des conditions physiologiques, la phosphorylation de Tau est donc le résultat de l'activité concertée de plusieurs protéines kinases et phosphatases. Un déséquilibre dans ce mécanisme bien orchestré est suggéré être à l'origine des tauopathies. L'hyperphosphorylation au sein du domaine de liaison aux microtubules diminue l'affinité de Tau pour ceux-ci (Biernat et al., 1993), et ce mécanisme conduit à l'agrégation de Tau en favorisant son auto-organisation en structures d'ordre élevé telles que les enchevêtrements neurofibrillaires. Lors des différentes étapes de son agrégation, Tau acquiert tout d'abord une conformation compétente qui diffère de sa conformation physiologique soluble, puis elle forme des dimères et de petits oligomères solubles appelés pré enchevêtrements, pour enfin former de grandes inclusions filamenteuses et insolubles, les enchevêtrements neurofibrillaires (Cieplak, 2019). Ainsi, la fraction de Tau insoluble contenant des niveaux élevés de Tau hyperphosphorylée est considérablement augmentée alors que la fraction de Tau soluble est quant à elle réduite avec le vieillissement dans un modèle murin transgénique de la MA (Hirata-Fukae et al., 2009). Certains auteurs ont cependant remis en cause la pathogénicité des grands agrégats insolubles de protéine Tau, qui ne seraient pas les espèces de Tau les plus toxiques. En effet, ils peuvent protéger les cellules des dommages causés par les petits oligomères solubles très toxiques de Tau en les séparant de l'environnement cellulaire en de grandes inclusions insolubles (Cowan and Mudher, 2013; Tenreiro et al., 2014; d'Orange et al., 2018). Il est intéressant de noter que récemment 542 protéines différentes ont été identifiées dans les enchevêtrements neurofibrillaires. Cela comprenait la protéine Tau, l'ubiquitine et l'apolipoprotéine E, mais aussi la protéine synaptique

VAMP2, la sous-unité vacuolaire-ATPase, ou encore la protéine de liaison à l'ARN hnRNPA1 (Drummond et al., 2020).

IV. Sécrétion et propagation de type prion de la protéine Tau

2.4.1 Sécrétion et internalisation de Tau par les neurones

Au début, la communauté scientifique pensait que Tau n'était libérée que passivement par les neurones en apoptose, mais il est connu maintenant que Tau est activement transférée entre les neurones et sécrétée dans l'espace extracellulaire. Il est supposé que les cellules peuvent sécréter et propager Tau via trois voies coexistantes: la sécrétion non-conventionnelle (translocation à travers la membrane plasmique), la sécrétion à partir d'exosomes et l'excrétion ectosomale (Merezhko et al., 2020; Peng et al., 2020).

- La sécrétion cellulaire permet à la protéine Tau d'être sécrétée dans l'espace extracellulaire sans membrane par translocation directe à travers la membrane plasmique et ainsi diffuser dans tout le SNC (Chai et al., 2012; Katsinelos et al., 2018).

- La sécrétion de Tau via les exosomes permet d'excréter Tau emprisonnée dans une vésicule membranaire (40–100 nm). La protéine Tau hyperphosphorylée a été détectée dans des exosomes isolés du LCR d'individus atteints de MA ou dans des cultures de neurones primaires (Saman et al., 2012; Wang et al., 2017). Les corps multi-vésiculaires (MVB) peuvent, alternativement à leur fusion avec les lysosomes, fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu dans le cytoplasme (Harding et al., 1983). Cette libération exosomale pourrait être avantageuse pour les neurones voulant éliminer des protéines indésirables, mais ce qui au départ serait bénéfique à un système de dégradation débordé pourrait causer à terme la propagation de protéines Tau anormales dans le cerveau. La sécrétion de Tau associée aux exosomes a été observée uniquement dans des systèmes de surexpression de Tau, suggérant que la voie des exosomes sert avant tout à éliminer l'excès de Tau intracellulaire (Vingtdeux et al., 2012). Il est intéressant de noter que la microglie peut également diffuser Tau via la sécrétion d'exosomes lors de la maladie, et de par sa migration transférer des espèces pathogènes de Tau vers de nouvelles zones du cerveau (Maphis et al., 2015; Bolós et al., 2017; Clayton et al., 2021).

- L'excrétion ectosomale permet de libérer Tau dans l'espace extracellulaire à l'intérieur d'une vésicule par bourgeonnement de la membrane plasmique via un processus de nucléation (50–1000 nm). Dujardin et collaborateurs ont réussi à montrer que Tau est principalement sécrétée dans les ectosomes et lorsqu'elle s'accumule, la voie exosomale est activée (Dujardin et al., 2014).

Le processus de sécrétion de Tau serait influencé par l'activité neuronale (Yamada et al., 2014). La stimulation de l'activité neuronale à la fois *in vitro* et *in vivo* améliore la libération de la protéine Tau : la stimulation des récepteurs AMPA augmente la libération de Tau par un mécanisme dépendant du calcium, et en retour la présence de Tau excite les neurones, conduisant à une sur-stimulation des neurones connectés, qui à son tour conduit à la sécrétion de Tau, créant un cercle vicieux (Pooler et al., 2013; Vogel et al., 2020).

La Tau sécrétée peut ensuite être internalisée par les neurones via divers mécanismes, notamment l'absorption basée sur les exosomes, les tunnels nanotube, l'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine, la translocation directe médiée par les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), l'endocytose médiée par les HSPG, et la macropinocytose dépendante de l'HSPG (Jiang and Bhaskar, 2020). Ainsi, il a été démontré que les HSPG servent de récepteurs pour l'internalisation de Tau : les agrégats libres de Tau se lient aux HSPG à la surface cellulaire pour stimuler leur absorption par micropinocytose (un processus dépendant de l'actine qui permet aux structures macromoléculaires d'entrer dans la cellule) (Holmes et al., 2013). Cette interaction est bloquée par l'héparine, un glycosaminoglycane sulfaté. De même, la protéine liée au récepteur des lipoprotéines de faible densité 1 (LRP1) contrôle l'endocytose de Tau par les neurones via un mécanisme dépendant des résidus lysine dans le MTBD de Tau, avec un rôle important dans la propagation de Tau dans le cerveau (Rauch, 2020). De plus, certains ont suggéré la présence d'une structure tubulaire appelée nanotubes entre les cellules favorisant le transfert de la protéine Tau. Cela pourrait être un autre mécanisme de transfert de cellule à cellule de Tau, même si ce mécanisme n'a jamais été confirmé *in vivo* (Abounit et al., 2016; Tardivel et al., 2016).

2.4.2 Transmission de la protéine Tau entre les neurones

La MA se caractérise par une vulnérabilité de régions cérébrales et de populations neuronales spécifiques. L'envahissement progressif du cerveau par cette pathologie Tau, débutant dans le

locus coeruleus, le cortex entorhinal, l'hippocampe – siège de la mémoire –, le lobe temporal et les régions polymodales associatives, est étroitement corrélé au déclin cognitif et à l'apparition des signes cliniques de la MA (Braak and Braak, 1991; Delacourte et al., 2002). Ainsi, la présence de Tau dans le lobe temporal est associée à des problèmes de mémoire antérograde, et une forte densité d'enchevêtrements neurofibrillaires dans l'hippocampe est corrélée à une désorientation spatiale (Giannakopoulos et al., 2000).

La progression des dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est donc hiérarchique et stéréotypée, ce qui amène à penser que le processus est progressif et suit des connexions interrégionales impliquant un mécanisme de type transmission ou propagation. La constatation que la protéine Tau se répand dans les régions du cerveau anatomiquement connectées a conduit à l'hypothèse que la forme pathologique de Tau serait transmise de neurone à neurone de la même manière que les protéines prion. Donc d'après cette hypothèse "Prion-like", la protéine Tau de conformation pathologique est libérée par les neurones portant des agrégats préexistants et est assimilée par les neurones connectés sains par l'intermédiaire des synapses (Clavaguera et al., 2014; Takeda, 2019). La Tau pathologique sert ensuite de modèle pour sa propre réplication, un processus appelé nucléation ou "seeding", et imprime sa conformation pathologique sur des protéines naïves dans les cellules réceptrices voisines (Guo and Lee, 2011; Guo et al., 2016). La protéine Tau ne satisfait pas tous les critères pour être considérée comme un véritable prion, elle n'est pas infectieuse mais est plutôt dite "prion-like" car capable de réplication spécifique à la souche de Tau. En effet, il a été rapporté que les monomères de Tau compétents pour la nucléation forment des agents de nucléation ou "seeds" morphologiquement distincts dans les différentes tauopathies, et ils sont également composés de différentes isoformes de Tau (Dinkel et al., 2011; Sanders et al., 2014; Kaufman et al., 2016; Narasimhan et al., 2017; Sharma et al., 2018). Ces agents de nucléations de Tau qui modèlent la conformation mal repliée de la Tau native sont majoritairement des oligomères solubles ou des fibrilles de petite taille (Lasagna-Reeves et al., 2012; Falcon et al., 2015; Mirbaha et al., 2015; Usenovic et al., 2015; Jackson et al., 2016b), et lorsque la Tau se polymérise en filaments, elle perd son activité de "seeding" (Alonso et al., 2006). Cependant, il existe à ce jour un manque de consensus sur ce point : la Tau monomérique est-elle suffisante pour initier le "seeding", ou alors les trimères de Tau sont-ils la taille minimale ? (Michel et al., 2014; Mirbaha et al., 2015). Il existe une grande variabilité entre les patients MA, avec des patients enclins à une nucléation élevée dont le cerveau est plus enrichi en espèces de Tau oligomériques. Ainsi, la quantité de phosphorylation sur des sites spécifiques était en

corrélation non seulement avec l'activité d'ensemencement mais aussi avec le taux de progression de la maladie (Dujardin, 2020).

In vivo, des expériences ont démontré d'une part que des fibrilles de Tau synthétiques induisaient une agrégation de Tau chez des souris transgéniques qui exprimaient la forme mutante P301L de la Tau humaine mais pas chez des souris de type sauvage (Peeraer et al., 2015). D'autre part, ces expériences ont démontré que la Tau pathologique dérivée du cerveau d'individus atteints de tauopathies, telles que la MA, induit une pathologie Tau chez les souris de type sauvage (Guo et al., 2016; Narasimhan et al., 2017), démontrant que les protéines Tau pathologiques dans les cerveaux humains malades ont des conformations uniques qui ne sont pas aisément reproduites avec leurs homologues protéiques recombinantes (Lasagna-Reeves et al., 2012; Clavaguera et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Les agents de nucléation de Tau se transmettent entre des neurones intacts et connectés avec une grande efficacité, ce qui suggère que la propagation de Tau mal repliée se produit entre des neurones vivants et fonctionnels à des stades très précoces avant la dégénérescence neuronale. L'agrégation de Tau est associée à l'hyperphosphorylation (Alonso et al., 1996; Wang et al., 2007a) et les charges négatives associées à l'hyperphosphorylation augmentent la propension à adopter une conformation structurelle alternative qui à son tour peut agir comme un modèle efficace pour que la Tau native se replie mal, s'agrège et se propage (Hallinan et al., 2019).

Il faut cependant souligner qu'il ne semble pas y avoir de démonstration concluante que la protéine Tau en se propageant altère les fonctions cérébrales ou la survie des neurones à qui elle est transmise. Dans des cultures primaires de neurones, les agrégats de Tau marqués par fluorescence se sont propagés efficacement de neurone à neurone mais n'ont pas altéré la survie, les terminaisons présynaptiques, les propriétés électrophysiologiques de base ou l'activité des neurones (Hallinan et al., 2019; Chang et al., 2021).

V. Les tauopathies

Les tauopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives progressives et hétérogènes souvent associées à l'âge, où des dépôts de protéine Tau anormale sont retrouvés dans le cerveau comme signature pathologique prédominante (tauopathies primaires) ou en combinaison avec la présence d'autres agrégats toxiques (tauopathies secondaires). Au sein de ces tauopathies, la

protéine Tau peut prendre différentes formes dans les neurones : pré-enchevêtrements (Tau neuronal cytoplasmique diffus), NFTs, corps de Pick, inclusions sphériques, neurites dystrophiques, fils de neuropiles (axonaux) et grains (dendritiques). La pathologie Tau peut également impliquer des inclusions de Tau dans les astrocytes et d'oligodendrocytes (Kovacs, 2016). Les protéines Tau pathologiques présentent ainsi un schéma biochimique spécifique et une distribution régionale différente, pouvant caractériser cinq classes principales de tauopathies (Duyckaerts et al., 1997; Sergeant et al., 2005). Ces différentes classes regroupent entre autres la maladie d'Alzheimer (MA), la démence frontotemporale (FTD), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale (CBD) et bien d'autres où la protéine Tau est hyperphosphorylée et agrégée pour former des filaments hélicoïdaux appariés insolubles (PHF) et finalement des enchevêtrements neurofibrillaires (NFT). En particulier, dans la MA, la pathologie Tau suit une évolution spécifique décrite par les stades de Braak (Braak and Braak, 1991) alors que dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP) par exemple, la pathologie Tau suit un schéma très différent (Verny et al., 1996).

Les 5 classes de Tauopathies sont organisées comme suit (Sergeant et al., 2008):

- Classe 0 : Démence du lobe frontal sans agrégats de Tau mais avec la présence de changements morphologiques dans le cerveau comme la perte neuronale, une spongiose et une gliose dans les couches corticales superficielles du cortex frontal et temporal (Zhukareva et al., 2001; Papegaey et al., 2016). Ces changements seraient liés à des mutations sur le gène de la progranuline (Baker et al., 2006).
- Classe 1 : Toutes les isoformes cérébrales de Tau sont agrégées. Cette tauopathie 3R+4R est caractérisée en western blot par des bandes à 60 kDa (exon 2, 3-,10-), 64 kDa (exon 2 et 10) et 69 kDa (exon 2,3 et 10). La maladie d'Alzheimer fait partie des tauopathies de classe 1, avec 9 autres pathologies dont le syndrome de Down (Hyman, 1992; Buee et al., 2000).
- Classe 2 : Les isoformes de Tau contenant la séquence codant pour l'exon 10 s'agrègent (agrégation de la protéine Tau avec quatre domaines de liaison aux microtubules). Dans cette catégorie sont regroupées la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale ou la démence à grains argyrophiles (Sergeant et al., 1999; Tolnay et al., 2002).
- Classe 3 : les isoformes Tau dépourvues de séquences codant pour l'exon 10 s'agrègent, comme par exemple dans la maladie de Pick ou la FTDP-17 (Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17) (Sergeant et al., 1997).

- Classe 4 : les isoformes Tau dépourvues des séquences codantes pour les exons 2, 3 et 10 s'agrègent. Cette classe ne contient que la dystrophie myotonique de type I et II, la forme la plus répandue de dystrophie musculaire survenant à l'âge adulte (Reardon and Harper, 1992; Vermersch et al., 1996).

Ainsi les divers processus de dégénérescences neurofibrillaires sont liés à la phosphorylation de différentes combinaisons d'isoformes de Tau dans des sous-populations de neurones (Mailliot et al., 1998). L'association de diverses souches de Tau qui en résulte avec différents troubles suggère qu'elles peuvent être en partie responsables des multiples résultats des tauopathies, expliquant comment l'agrégation de la même protéine peut provoquer différentes maladies et diverses progressions et phénotypes (Lo Cascio et al, 2020).

Bien que les tauopathies non-MA moins répandues par définition soient également caractérisées par une pathologie Tau, elles diffèrent néanmoins de la MA et les unes des autres en ce qui concerne plusieurs autres caractéristiques pathologiques et cliniques. Notamment, un grand nombre de mutations sur le gène *MAPT* très rares (principalement à l'intérieur ou à côté du domaine de liaison aux microtubules) peuvent chacune provoquer des tauopathies non liées à la MA, en particulier la dégénérescence lobaire frontotemporale (FTLD), mais sans jamais causer la MA (Goedert and Spillantini, 2019).

Chapitre 3 : La protéine précurseur du peptide amyloïde

I. Génétique et structure de l'APP

3.1.1 Gène et isoformes de l'APP

Le précurseur du peptide β -amyloïde (APP) appartient à la famille des gènes *APP*, à laquelle sont également étroitement apparentés les gènes codant pour les protéines APLP1 et APLP2 (Amyloid beta precursor like protein 1 et 2). APLP1 n'est synthétisée que dans le cerveau alors que APLP2 et APP sont ubiquitaires. L'APP est codé par un seul gène qui se situe sur le chromosome 21 au locus 21q21, et est estimé à 290 586 paires de bases (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987; Yoshikai et al., 1990; Lamb et al., 1993). C'est une protéine hautement conservée qui peut être retrouvée dans le cerveau de nombreux animaux, tels que

l'Homme, le singe, le chien et la souris (Qiu et al., 2015). Le gène *APP* possède 19 exons (au minimum 18) dont l'épissage alternatif des exons 7, 8 et 15 donne naissance à une dizaine d'isoformes variant de 365 à 770 acides aminés. Il existe trois isoformes majeures de l'*APP* : l'*APP695*, l'*APP751* et l'*APP770*, différant par l'inclusion ou non des exons 7 et/ou 8 et pouvant toutes conduire *in fine* à la production du peptide A β .

Les isoformes 751 et 770 de l'*APP* sont majoritairement produites dans les cellules non neuronales tandis que l'isoforme *APP695* est spécifiquement retrouvée dans les neurones où elle est fortement synthétisée. Cette différence de localisation peut être associée à l'absence des exons 7 et 8 dans l'isoforme *APP695*, codant pour un domaine inhibiteur de sérine protéase de type Kunitz (KPI) (Neve, 1988; Tanzi et al., 1988). La synthèse d'*APP695* est nettement augmentée au cours de la différenciation neuronale, mais l'expression gliale de l'*APP* n'a pas été observée *in vivo*.

3.1.2 Structure de la protéine APP

L'*APP* est une protéine membranaire de type I orientée avec son extrémité N-terminale dans l'espace extracellulaire et son extrémité C-terminale dans l'espace intracellulaire. Les trois isoformes partagent la structure conservée de la protéine avec un domaine extracellulaire plus grand, un court domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Muresan and Ladescu Muresan, 2015). L'ectodomaine comprend un domaine riche en cystéine (E1), un domaine acide (AC), un domaine riche en hélices α (E2) et une partie du domaine A β s'étendant également dans le domaine transmembranaire. Le domaine cytoplasmique court contient un motif YENPTY conservé responsable des interactions protéiques. Le domaine E1 contient un site de liaison à l'héparine (HBD) et un domaine de liaison aux métaux (MBD) avec des sites de liaison au cuivre et au zinc. Le domaine E2 est composé de six hélices α formant une structure en bobine enroulée. L'*APP770* et l'*APP751* contiennent toutes deux un domaine inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz (KPI) codé par l'exon 7 après le domaine AC. De plus, l'isoforme *APP770* contient un domaine Ox2 codé par l'exon 8 suivant le domaine KPI, l'*APP695* ne possédant ni le domaine KPI et ni Ox2 (Figure 12).

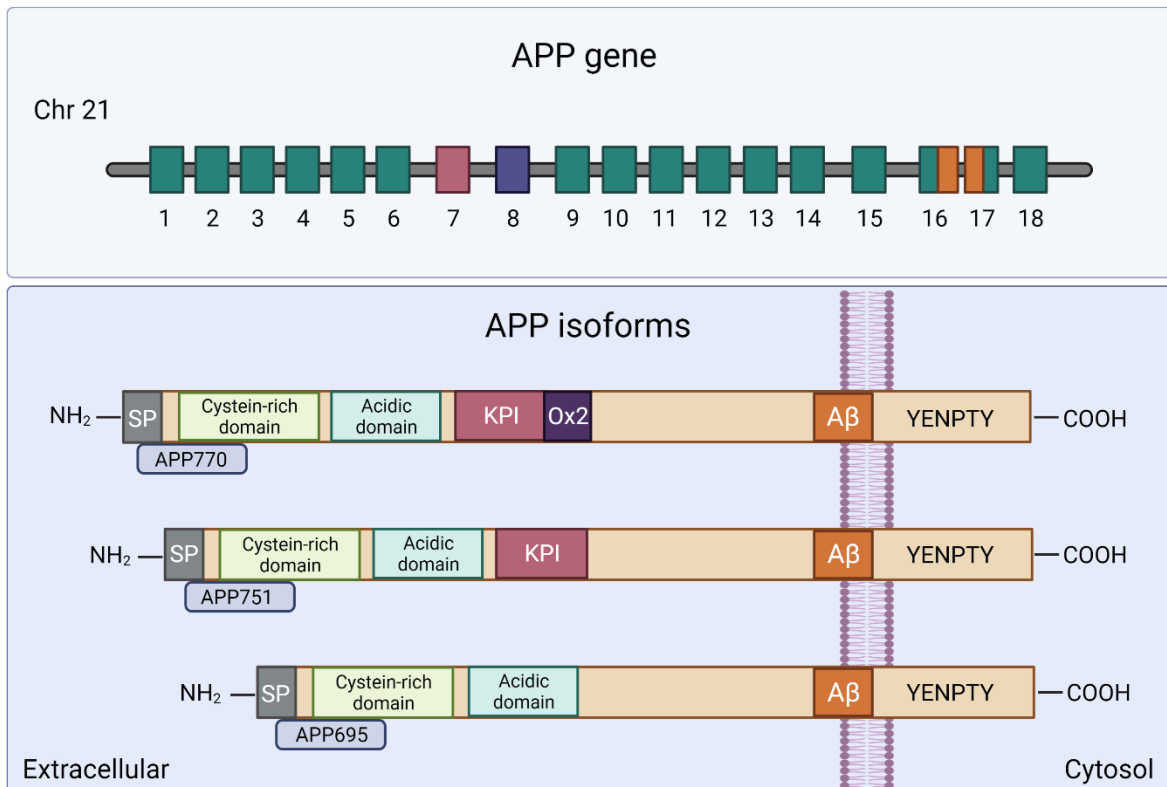


Figure 12 : **Le gène APP et les différentes isoformes de la protéine APP.** Le gène *APP*, constitué de 18 exons, est situé sur le chromosome 21 (21q21.2-3). La région codant pour la séquence amyloïde comprend une partie des exons 16 et 17 (en orange). L'*APP* est alternativement épissée en plusieurs isoformes, ici représentées les 3 isoformes les plus exprimées dans le SNC : APP695, APP751 et APP770. Certaines isoformes contiennent un domaine KPI de 57 acides aminés (en rose) et un domaine OX-2 de 19 acides aminés (en violet) dans les séquences extracellulaires. En N-terminal le peptide signal (SP) est représenté en gris, suivi d'un domaine riche en cystéine et d'un domaine acide. Un motif YENPTY est présent dans la partie C-terminale de la protéine APP. Modifié d'après Campos-Pea et al., 2014.

Tous les membres de la famille APP sont de véritables protéines multifonctionnelles et peuvent former de grands complexes de signalisation avec diverses protéines transmembranaires et partenaires de liaison intracellulaire. L'APP et les APLP peuvent former des dimères, leur permettant de fonctionner comme des molécules d'adhésion synaptique *in vitro* et au niveau de la jonction neuro-musculaire *in vivo* (Müller et al., 2017). On peut également noter que les isoformes de l'APP contenant le domaine KPI sont retrouvées en plus grande quantité dans le cerveau des malades de la MA et pourraient être associées à la progression de la maladie. En effet, il a été montré que la protéolyse de l'APP en Aβ est régulée par l'homodimérisation, qui implique à la fois les régions extracellulaires et juxtamembranaires/transmembranaires (JM/TM) de l'APP. L'APP751 s'est avéré former significativement plus d'homodimères que APP695, ce qui signifie que le domaine KPI joue un rôle majeur dans la dimérisation de l'APP (Ben Khalifa et al., 2012a, 2012b).

II. Fonctions et localisation cellulaire de l'APP

3.2.1 Localisation cellulaire et modifications post-traductionnelles de l'APP

La protéine précurseur du peptide β -amyloïde (APP) est une protéine transmembranaire localisée à la surface des synapses. L'APP est tout d'abord synthétisée dans le réticulum endoplasmique, puis elle est transportée dans l'appareil de Golgi où elle peut subir différentes modifications post-traductionnelles, telles que la N- et O- glycosylation, la phosphorylation, la sulfatation ou l'acétylation (Walter and Haass, 2000). L'APP maturée est ensuite transportée du réseau trans-golgien vers la membrane cellulaire. L'APP n'ayant pas été clivée par les secrétases ou étant devenue non fonctionnelle peut être internalisée et se retrouver dans les endosomes précoces puis tardifs, lieux où les catabolites délétères sont principalement formés, puis le long de la voie endolysosomale et subir une dégradation protéolytique (Koo et al., 1996; Selkoe et al., 1996; Kinoshita et al., 2003; Lorenzen et al., 2010; Chia et al., 2013). Alternativement, l'APP peut être recyclée à la membrane plasmique (Vetrivel and Thinakaran, 2006). Ainsi, des preuves substantielles indiquent maintenant que la MA est susceptible de résulter d'un trafic membranaire défectueux dans les deux voies sécrétoires et endocytiques (Toh and Gleeson, 2016). La demi-vie de l'APP est relativement courte, environ 10 minutes à la surface cellulaire, et son 'turnover' est assez rapide, entre 30 et 90 minutes.

L'APP possède huit sites potentiels de phosphorylation dans son domaine cytoplasmique, parmi lesquelles sept sont phosphorylés dans le cerveau des patients Alzheimer (Y653, S655, T668, S675, Y682, T686 et Y687 – numérotation selon l'isoforme APP695)(Lee et al., 2003). Il a été démontré que la phosphorylation constitutive de l'APP sur la T668 était observée spécifiquement dans le cerveau et contribuait à la neurodégénération (Chang et al., 2006). La production d'A β est significativement réduite lorsque la phosphorylation sur la T668 est abolie ou inhibée. La phosphorylation sur la T668 faciliterait ainsi le clivage de l'APP par BACE1 pour augmenter la génération d'A β (Lee et al., 2003; Feyt et al., 2007).

3.2.2 Rôles physiologiques de la protéine APP

L'APP possède de nombreux rôles physiologiques, en particulier à la synapse où elle joue un rôle crucial dans la formation, le maintien, le renouvellement et la plasticité des synapses, y compris dans la potentialisation à long terme (LTP) (Dawson et al., 1999; Seabrook et al., 1999;

Ring et al., 2007; Weyer et al., 2011, 2014; Tyan et al., 2012; Ludewig and Korte, 2016; Zou et al., 2016). En effet, les niveaux de synthèse de la protéine APP sont étroitement corrélés avec la densité et le nombre d'épines dendritiques présentes sur les neurones, et elle facilite également la libération de neurotransmetteurs (Lee et al., 2010b; Fanutza et al., 2015). Des niveaux physiologiques d'APP sont nécessaires pour un positionnement approprié des neurones, son expression culminant à la période de développement chez les mammifères où se produit la synaptogenèse corticale la plus rapide, vers la deuxième semaine postnatale (Löffler and Huber, 1992; Young-Pearse et al., 2007). Les interactions trans-synaptiques entre les protéines APP pré- et postsynaptiques favorisent l'adhésion des synapses (Wang et al., 2009b).

La protéine APP joue un rôle clé dans l'homéostasie neuronale (van der Kant and Goldstein, 2015), en agissant sur la signalisation intracellulaire en transmettant des informations sur les conditions extracellulaires (des dommages neuronaux par exemple), et sur la transcription de certains facteurs trophiques importants comme le GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor). La régulation APP-dépendante de l'expression du GDNF affecte la différenciation neuronale et musculaire fondamentale pour la maturation de la jonction neuromusculaire *in vivo* (Stanga et al., 2016). L'APP a également une fonction trophique importante et peut être impliquée dans le développement des cellules souches neuronales, la prolifération cellulaire, la survie neuronale et même être un facteur neuroprotecteur (Bolós et al., 2014; Milosch et al., 2014; Wu et al., 2016; Hefter and Draguhn, 2017). Les hypoxies cérébrales aiguës (AVC, arrêt cardiaque) ou chroniques (maladie cérébrovasculaire) entraînent une augmentation de la synthèse de l'APP, cette régulation jouant un rôle bénéfique après le traumatisme. Il a été proposé que l'APP se lie aux HSPG pour exercer son action neuroprotectrice, ou encore via la régulation de l'homéostasie calcique (Plummer et al., 2016).

Dans les études des modèles murins, l'étendue complète des fonctions de la protéine APP peut être masquée chez les souris APP-KO en raison de la compensation par les protéines APLP de la même famille. Les souris dépourvues d'un seul membre de la famille APP sont pleinement viables et présentent des troubles synaptiques et comportementaux uniquement lorsqu'elles sont âgées. En effet, les souris APP-KO de 12 mois ou plus présentent une densité d'épines dendritiques réduite dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, ainsi qu'une LTP altérée et des troubles de la mémoire (Phinney et al., 1999; Ring et al., 2007; Lee et al., 2010b). Aucune anomalie n'a été retrouvée chez les souris APLP2-KO jeunes ou âgées (von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000; Weyer et al., 2011; Midthune et al., 2012). En revanche, le phénotype

APP/APLP2-DKO est mortel peu de temps après la naissance en raison de déficits dans la morphologie synaptique et la libération des transmetteurs à la jonction neuromusculaire (Wang et al., 2005; Klevanski et al., 2014). Tous ces éléments concordent pour souligner l'importance de la protéine APP dans le cerveau et expliquer la très forte conservation de cette protéine au cours de l'évolution, ainsi que la redondance dans les rôles exercés par APP, APLP1 et APLP2.

III. Clivages et catabolites

3.3.1 Protéolyse amyloïdogénique et non amyloïdogénique : α -secrétase, β -secrétase et γ -secrétase

La protéine APP peut subir plusieurs clivages différentiels selon deux voies, la voie amyloïdogénique et la voie non-amyloïdogénique. La voie non-amyloïdogénique est initiée par l' α -secrétase (ou ADAM10, A Disintegrin And Metalloprotease 10), qui clive l'APP au milieu de la séquence de la protéine A β pour libérer un fragment extracellulaire soluble sAPP α et un fragment carboxy-terminal APP-CTF α (ou C83) (Suh and Checler, 2002). Ce dernier sera ensuite pris en charge par la γ -secrétase qui va cliver le fragment C83 en AICD (APP intracellular domain) et en peptide p3 (ou A β 17-42 ; Gowing et al., 1994). Il existe en réalité plusieurs α -secrétases : ADAM10 réalise le clivage dit "constitutif" qui est actif continuellement, et ADAM17 (appelée aussi TACE, pour Tumor necrosis Alpha Converting Enzyme) et ADAM9 fonctionnent comme des α -secrétases régulées, par activation de la cascade PKC notamment (Asai et al., 2003). La voie non-amyloïdogénique est la voie majeure dans laquelle s'engage l'APP et représente environ 90% de sa protéolyse. Dans 10% des cas, l'APP suit la seconde voie, la voie amyloïdogénique (Penke et al., 2017).

La voie amyloïdogénique débute par un clivage de l'APP par la β -secrétase (aussi appelée BACE-1, ou Memapsin-2) en amont de l'acide aspartique-1 (Asp1) du domaine A β (entre les résidus 596 et 597 de l'APP695) qui va générer un fragment soluble sAPP β (environ 110 kDa) extracellulaire et un fragment APP-CTF β ou C99 (12 kDa) transmembranaire. La γ -secrétase va ensuite cliver ce fragment C99 en peptide A β d'une part et AICD d'autre part (Tolia and De Strooper, 2009) (Figure 13).

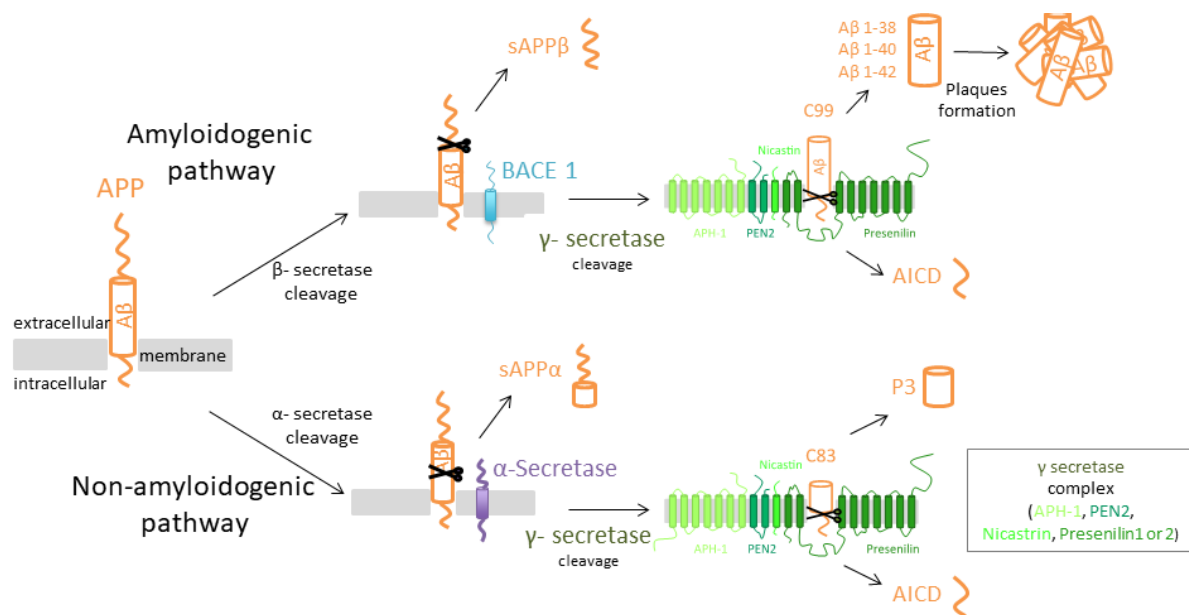


Figure 13 : **Les deux voies principales dans la protéolyse de l'APP.** Ces voies font intervenir plusieurs sécrétases, dont l' α -sécrétase et la γ -sécrétase pour la voie non-amyloïdogénique et la β -sécrétase (BACE1) et la γ -sécrétase pour la voie amyloïdogénique. La voie non-amyloïdogénique produit plusieurs fragments, dont un sAPP α après le clivage par l' α -sécrétase et un APP-CTF α (ou C83), qui donnera un AICD et un fragment p3 après le clivage de la γ -sécrétase. Dans la voie amyloïdogénique, le clivage par BACE1 produit un sAPP β ainsi qu'un APP-CTF β (ou C99). Ce dernier va être clivé par la γ -sécrétase pour donner un AICD et un fragment A β de longueur variable.

Le peptide AICD a été initialement identifié dans le cerveau de patients atteints de la MA (Passer et al., 2000) où il a été démontré qu'il participait au déclenchement de signaux apoptotiques. En effet, grâce à sa séquence spécifique Y⁶⁸²ENPTY⁶⁸⁷, un motif d'endocytose médiée par la clathrine, l'AICD interagit avec Fe65 afin d'effectuer une translocation vers le noyau (Konietzko et al., 2010). L'AICD exerce ainsi une toxicité via des mécanismes dépendants de la transcription en formant un complexe tripartite avec Fe65 et l'histone acétyltransférase Tip60 dans le noyau (Cao and Südhof, 2001), induisant l'expression de GSK-3 β , suivie d'une phosphorylation de la protéine Tau, qui contribuerait à la pathogenèse de la MA (Kim et al., 2003). La génération d'AICD a lieu au niveau de la membrane plasmique et/ou dans les endosomes précoces (Vingtdeux et al., 2007a). Bien que les AICD produits via les voies amyloïdogéniques ou non-amyloïdogéniques aient la même séquence peptidique, elles semblent être fonctionnellement distinctes. L'AICD produit après le clivage de la β -sécrétase est transporté vers le noyau, tandis que celui produit après le clivage de l' α -sécrétase est rapidement dégradé dans le cytosol par l'enzyme dégradant l'insuline.

L'engagement de l'APP dans le traitement amyloïdogène et non amyloïdogène dépend des niveaux cellulaires des α - et β -sécrétases et du trafic d'APP vers les organites subcellulaires

exprimant ces protéases. Il a été suggéré que le clivage non amyloïdogène de l'APP est localisé principalement dans la membrane plasmique, alors que le clivage amyloïdogène se déroule de manière intracellulaire (Penke et al., 2017). De multiples mécanismes peuvent être mis en place pour moduler la protéolyse de l'APP, par exemple en agissant via un blocage physique (par exemple, BRI2) pour empêcher l'accès des protéases à l'APP, ou en modifiant le trafic de l'APP (par exemple, le récepteur SORLA), en augmentant ou en réduisant ainsi la probabilité que l'APP rencontre les secrétases.

La γ -secrétase est un complexe multi-protéique de haut poids moléculaire composé de 4 sous-unité : la Préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2), la Nicastrine (NCT), Aph-1 (Anterior pharynx defective) et Pen-2 (Presenilin enhancer) (Edbauer et al., 2003; Kimberly and Wolfe, 2003; Takasugi et al., 2003; De Strooper and Annaert, 2010) (Figure 14). Le complexe γ -secrétase contient PS1 ou PS2, qui sont le centre catalytique du complexe enzymatique (De Strooper et al., 1998; Wolfe et al., 1999). Il a été montré que les complexes de γ -secrétase contenant PS1 étaient ciblés vers la membrane plasmique, tandis que ceux contenant PS2 étaient adressés plutôt au réseau trans-Golgi, aux endosomes de recyclage et endosomes tardifs (Meckler and Checler, 2016; Sannerud et al., 2016). En conséquence, PS2 clive l'APP dans les endosomes tardifs et génère un pool de formes longues d'A β intracellulaire plus important en comparaison de PS1. Les mutations associées à la MA familiale (FAD) de PSEN2 augmentent ainsi davantage les niveaux de formes longues et toxiques d'A β (Sherrington et al., 1995). La Nicastrine est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui agirait comme récepteur de substrat au sein du complexe (Shah et al., 2005). Elle est impliquée dans le clivage menant à la production de peptides A β (Yu et al., 2000). L'activité protéasique de la γ -secrétase est régulée par le pH avec une activité optimale à pH 6,3. La γ -secrétase possède plus de 90 substrats dont l'APP et son inhibition peut ainsi perturber d'autres voies (Carroll and Li, 2016). On peut citer entre autres Notch, IL-1R 1/2, ErbB-4, NRG1, le récepteur à l'insuline ou encore ApoER2 (Pardossi-Piquard and Checler, 2012).

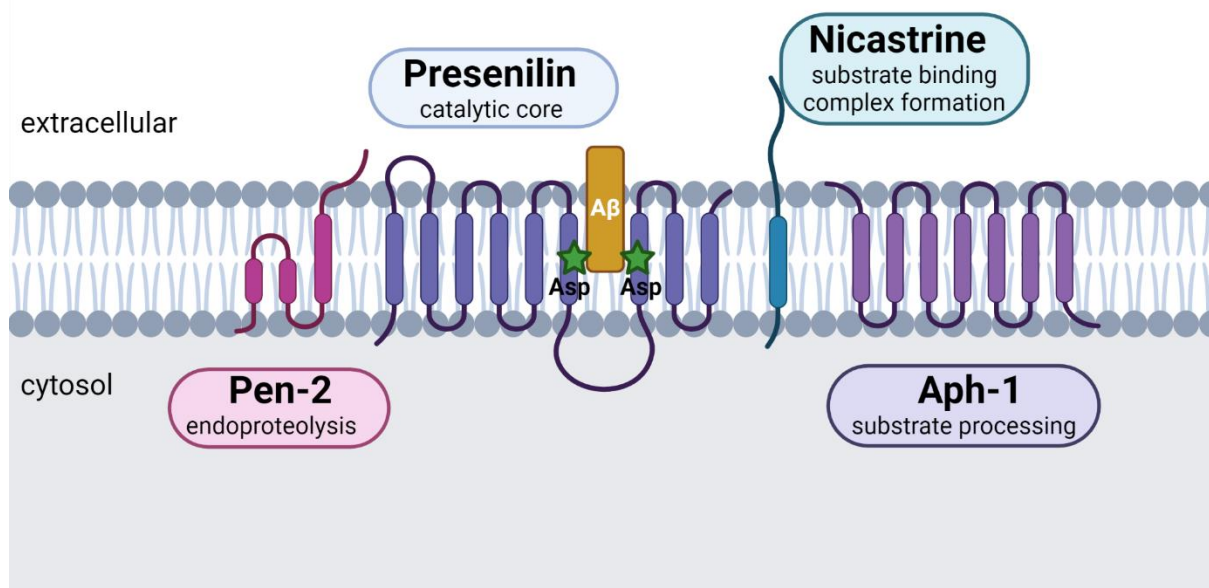


Figure 14 : **Les différentes sous-unités du complexe γ -secrétase.** Le complexe γ -secrétase est formé par l'assemblage séquentiel d'Aph-1, de la nicastrine, de la préséniline et de Pen-2. Tout d'abord, l'Aph-1 et la nicastrine s'assemblent pour former le squelette du complexe, puis la préséniline est incorporée. Enfin, Pen-2 est recruté et la préséniline complète est endoprotéolysée, activant l'enzyme. La nicastrine joue un rôle dans la reconnaissance du substrat. Aph-1 est cruciale pour la structure et la stabilité du complexe, et peut jouer un rôle supplémentaire dans la détermination de la longueur des espèces A β produites en fonction de l'isoforme incorporée dans le complexe γ -secrétase. Le motif GXXXG dans Aph-1 est essentiel pour l'assemblage du complexe γ -secrétase. La préséniline, une protéine à 9 domaines transmembranaire possédant 2 isoformes, est la sous-unité catalytique de la γ -secrétase. Enfin Pen-2 est nécessaire pour l'endoprotéolyse de la préséniline et l'activation de la γ -secrétase.

3.3.2 Les clivages non-conventionnels de l'APP

Récemment, de nouvelles enzymes ont été identifiées comme intervenant dans le processus catalytique de l'APP : la η -secrétase (MT5-MMP), la δ -secrétase (ou asparagine endopeptidase, AEP) et la méprine β (Andrew et al., 2016) (Figure 15). Ces enzymes catalysent des clivages physiologiques qui peuvent se retrouver altérés dans la MA :

La η -secrétase (MT5-MMP ou MMP-24) est l'enzyme responsable du clivage η de l'APP qui entraîne la libération d'un fragment sAPP η (80 à 95 kDa) et d'un fragment APP-CTF η (30 kDa) transmembranaire. L'APP η -CTF peut être clivé soit par la β -secrétase pour former un fragment soluble A η - β (12 kDa) et un APP-CTF β , ou par l' α -secrétase libérant un fragment soluble A η - α ($\approx$ 12/16 kDa) et un APP-CTF α . Il peut être alternativement dégradé par les lysosomes (Wang et al., 2015). Ces fragments s'avèrent

synaptotoxiques car ils altèrent la LTP (Willem et al., 2015). Il a été observé que MT5-MMP contribue à la progression de la pathologie Alzheimer dans un modèle transgénique, par le biais du clivage de l'APP, mais aussi par sa contribution au trafic intracellulaire de l'APP. De plus, l'absence de MT5-MMP corrige les déficits de LTP observés dans les souris Alzheimer (Baranger et al., 2016b, 2016a).

- Le clivage de l'APP par δ -secrétase (ou AEP) s'opère dans les endolysosomes et libère des fragments solubles sAPP1-373 (80 kDa) ou sAPP 1-585 (130 kDa) et APP- δ CTF374-695 ou APP- δ CTF586-695. Le clivage de l'APP par la δ -secrétase favorise un clivage ultérieur par la β -secrétase, augmentant ainsi la production d'A β . De plus, la quantité de δ -secrétase disponible augmente avec le vieillissement (Zhang et al., 2015).
- La Méprine β est une métalloprotéase dépendante du zinc, qui clive APP au niveau de la surface cellulaire. Ce clivage produit des fragments A β 2-x, qui ont une capacité d'agrégation supérieure aux peptides A β 1-x, bien qu'ils soient présents en plus faible quantité dans le cerveau (Bien et al., 2012; Becker-Pauly and Pietrzik, 2016).

L'APP peut également être le substrat de différentes caspases (Barnes et al., 1998; Weidemann et al., 1999; Lu et al., 2000). Leur clivage s'opère après l'acide aspartique 664 dans la partie C-terminale de l'APP, de l'APPCTF ou de l'AICD, libérant ainsi en Nter un APP Δ 31 et en Cter un fragment de 31 acides aminés appelé C31, Jcasp et un peptide A β ou p3.

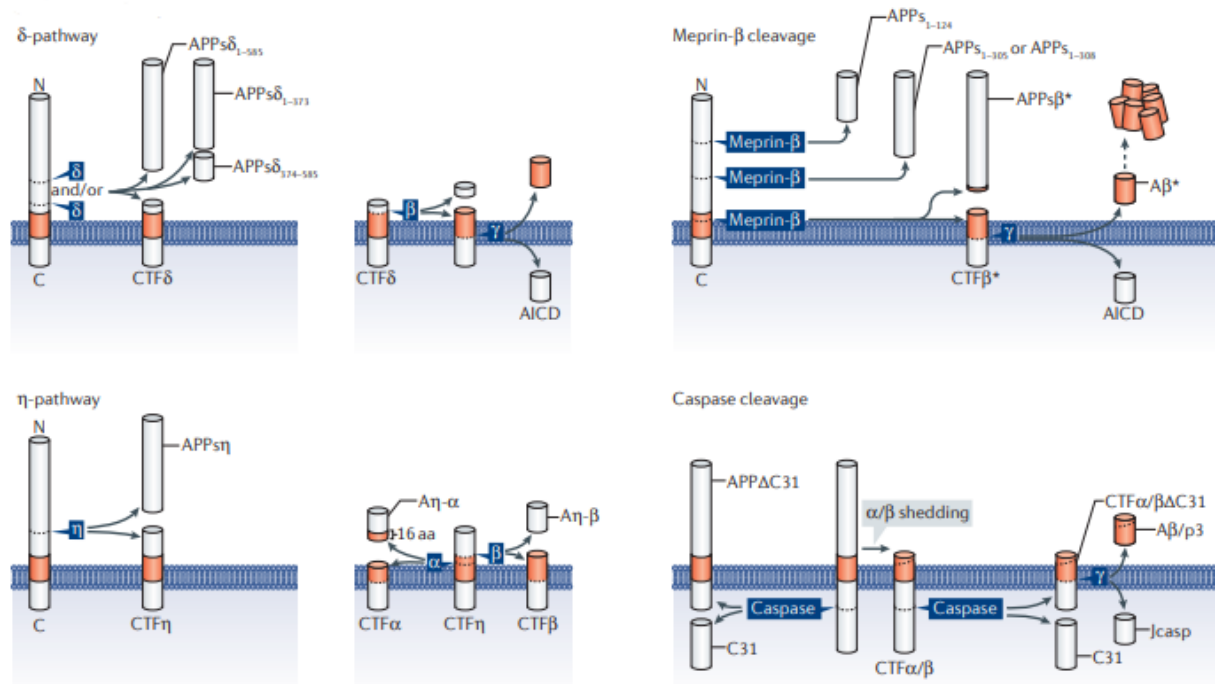


Figure 15 : **Les clivages non-conventionnels de la protéine APP.** Le clivage par la δ -secrétase produit trois fragments APPs δ solubles et le fragment C-terminal- δ (CTF δ), qui est ensuite traité par la β -secrétase et la γ -secrétase (schéma supérieur gauche). Le clivage par la Méprin- β sur trois sites potentiels donne lieu à trois fragments solubles (schéma supérieur droit). Le fragment APPs β^* contient un résidu supplémentaire par rapport aux APPs β (produits par la β -secrétase) ; CTF β^* est le fragment C-terminal produit suite à la libération des APP β^* et est un résidu plus court que les CTF β classiques. A β^* est un fragment A β 2-x tronqué en amino-terminal. Le clivage par la η -secrétase produit APPs η et CTF η solubles, qui sont traités par la α -secrétase ou la β -secrétase pour générer les fragments A η - α ou A η - β (schéma inférieur gauche). Les caspases clivent l'APP dans son domaine intracellulaire pour donner C31 et, après clivage de la γ -secrétase, Jcasp (Müller et al., 2017).

Le clivage par la δ -secrétase produit trois fragments APPs δ solubles et le fragment C-terminal- δ (CTF δ), qui est ensuite traité par la β -secrétase et la γ -secrétase (schéma supérieur gauche). Le clivage par la Méprin- β sur trois sites potentiels donne lieu à trois fragments solubles (schéma supérieur droit). Le fragment APPs β^* contient un résidu supplémentaire par rapport aux APPs β (produits par la β -secrétase) ; CTF β^* est le fragment C-terminal produit suite à la libération des APP β^* et est un résidu plus court que les CTF β classiques. A β^* est un fragment A β 2-x tronqué en amino-terminal. Le clivage par la η -secrétase produit APPs η et CTF η solubles, qui sont traités par la α -secrétase ou la β -secrétase pour générer les fragments A η - α ou A η - β (schéma inférieur gauche). Les caspases clivent l'APP dans son domaine intracellulaire pour donner C31 et, après clivage de la γ -secrétase, Jcasp.

3.3.3 Le peptide A β : clivages, fonctions et propagation

Les différents fragments A β

La γ -secrétase peut cliver le fragment C99 à plusieurs endroits, donnant des tailles de peptides A β différents. Dans des conditions physiologiques, les principales espèces générées sont A β 1-40 (plus de 50 % de l'A β total), avec A β 1-37, 1-38, 1-39 et 1-42 générés à des niveaux inférieurs (environ 5–20 % des A β). Dans certains cas, des peptides A β supplémentaires (par exemple, A β 1-34, 1-36, 1-41 et 1-43) sont générés (Seubert et al., 1992; Wang et al., 1996). Les changements dans la production d'A β vers A β 1-42 ou, dans de rares cas, A β 1-42 et A β 1-43 sont corrélés à la MA (Iwatsubo et al., 1994; Younkin, 1998; Kretner et al., 2016). Ainsi dans la MA, la production de ces formes longues augmente et conduit à la formation des plaques dont le constituant le plus abondant est le peptide A β 42, issu de la voie amyloïdogénique de la protéolyse de l'APP. L'étape de génération d'A β 1-40 s'effectue principalement dans le réticulum endoplasmique, alors que A β 1-42 est généralement produit dans le réseau transgolgien. Les peptides A β peuvent également être produits dans les tissus périphériques (Citron et al., 1994; Kuo et al., 2000) et sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (Deane and Zlokovic, 2007), ce qui suggère que l'A β dérivé de la périphérie pourrait contribuer à la pathologie A β dans le cerveau.

Fonctions du peptide A β

Depuis la découverte du peptide A β en 1984, les recherches sur la MA se sont presque exclusivement focalisées sur son rôle pathologique. Il a été démontré que les oligomères A β 1-42 solubles induisent une variété d'effets neurotoxiques, y compris une perméabilité membranaire, perturbent la transmission synaptique, inhibent la LTP hippocampique et altèrent les fonctions cognitives (Laurén et al., 2009; Butterfield and Sultana, 2011; Ozdemir et al., 2013; Morkuniene et al., 2015). Cependant, toutes les formes de peptides A β 1-42 ne sont pas toxiques. En fait, les monomères A β 1-42 se sont avérés neuroprotecteurs, en particulier à de faibles concentrations picomolaires. C'est en 1990 que les fonctions physiologiques d'A β ont été mises en lumière pour la première fois lorsque Yankner et ses collaborateurs (Yankner et al., 1990) ont montré que ce peptide à faible concentration pouvait avoir des propriétés neurotrophiques pour les neurones hippocampiques immatures. Dans la lignée de ce constat, les monomères A β induisent la survie des neurones en développement sous privation de facteurs

trophiques et protègent les neurones matures contre la mort cellulaire excitotoxique (Giuffrida et al., 2009). A β peut fonctionner comme une molécule de signalisation, un facteur transcriptionnel, un régulateur du transport du cholestérol et un agent antimicrobien (Soscia et al., 2010). Outre la fonction physiologique normale de A β 1-40 et A β 1-42, le groupe de Chen (Chen and Dong, 2009) a découvert que différents types d'A β peuvent induire une différenciation des cellules progénitrices neurales (NPC) en différents types cellulaires. L'A β 1-40 soluble peut induire la différenciation des NPC en neurones, tandis que l'A β 1-42 peut induire la différenciation des NPC en astrocytes. Ces résultats ont soutenu la fonction physiologique d'A β dans la nutrition neuronale et la différenciation cellulaire. La démonstration la plus probante du rôle physiologique de l'A β dans le processus de formation de la mémoire a été apportée lorsque la production du peptide endogène était bloquée et que les souris ont montré des troubles cognitifs importants (Garcia-Osta and Alberini, 2009) et que la LTP hippocampique a été abrogée (Puzzo et al., 2011), les deux effets étant rétablis par l'ajout d'A β 1-42 exogène.

A β 1-40 et A β 1-42 diffèrent par une isoleucine et une alanine supplémentaire à l'extrémité C-terminale de A β 1-42. Du fait du positionnement de ces deux acides aminés dans la région C-terminale de A β 1-42, l'importance de cette région a été confirmée comme étant cruciale pour les différents mécanismes d'agrégation (Socher et al., 2014). Cette différence structurelle se retrouve également au niveau de leur activité respective. L'A β 1-40 est capable d'inhiber l'agrégation du peptide A β 1-42. A β 1-40 séquestre en fait l'A β 1-42 dans des tétramères mixtes stables, empêchant ainsi l'oligomérisation d'A β 1-42 et la formation du dodécamère possiblement toxique, et par conséquent le développement potentiel de la MA (Murray et al., 2009; Bate and Williams, 2010). Une augmentation mineure du rapport A β 1-42/A β 1-40 stabilise les espèces oligomères toxiques et augmente la neurotoxicité (Kuperstein et al., 2010). McGowan et al. ont rapporté qu'aucune plaque amyloïde n'a été trouvée dans le cerveau de la souris transgénique qui surexprime A β 1-40 (McGowan et al., 2005; Qiu et al., 2015).

Ces études révèlent que la clé entre toxicité et trophisme des peptides A β se trouve dans la concentration de ces peptides, l'espèce majoritaire produite et leur niveau d'agrégation. La production d'A β n'est ainsi pas délétère en soi, mais c'est le dérèglement dans la production/clairance et l'agrégation de ce peptide qui rend sa présence toxique pour les neurones, amenant l'hypothèse d'une "perte de fonction" physiologique pour un gain de fonction pathologique.

Propagation et différentes souches d'A β

Les dépôts anormaux de peptide A β apparaissent généralement avec une distribution spatiale hiérarchique, ce qui suggère que A β , tout comme la protéine Tau, pourrait se propager entre différentes zones du cerveau (Thal et al., 2002). Ainsi, plusieurs études ont démontré le transfert d'A β dans des modèles cellulaires (Nath et al., 2012) et animaux. Notamment en 2000, Walker et collaborateurs ont mis en évidence que l'inoculation intracérébrale d'extraits de cerveau de patients atteints de MA dans un modèle de souris surexprimant l'APP induisait le développement d'un dépôt cérébral d'A β après une période d'incubation de 5 mois (Kane et al., 2000). Ceci a été appuyé par la démonstration que les agrégats d'A β composés exclusivement de peptides A β synthétiques pouvaient également initier un dépôt cérébral d'A β dans un modèle de souris surexprimant l'APP, avec cependant une activité moindre (Stöhr et al., 2012). Une autre étude est venue confirmer ces observations par l'inoculation de souris ne surexprimant pas l'APP avec des extraits de cerveaux Alzheimer purifiés, ce qui a entraîné l'induction de type prion d'un dépôt cérébral d'A β , démontrant en même temps que la surexpression d'APP n'est pas une condition préalable à la propagation d'A β (Ruiz-Riquelme et al., 2018).

Ces expériences indiquent que, comme les protéines prions (PrP), les agrégats d'A β dérivés de cerveaux atteints de MA sont capables d'auto-propagation. Les A β prion semblent également se propager loin du site d'inoculation d'origine (Eisele et al., 2009; Ye et al., 2015), fournissant peut-être une partie de l'explication de la progression de la pathologie A β observée dans les patients MA. Les assemblages spécifiques d'A β responsables de l'induction du dépôt cérébral d'A β n'ont pas encore été formellement identifiés, mais les oligomères d'A β de poids moléculaire inférieur et les protofibrilles ont été suggérés comme étant particulièrement neurotoxiques et comme étant des agents de nucléation permettant une agrégation ultérieure (Gouras et al., 2010). Les oligomères d'A β peuvent s'accumuler à l'intérieur des cellules, notamment à cause de problèmes de clairance intracellulaire, et ensuite se propager d'une cellule à l'autre (Domert et al., 2014). Les mécanismes sous-jacents de la propagation des oligomères d'A β restent incomplètement compris, mais pourraient impliquer les exosomes. En effet, les exosomes provenant de cerveaux de patients MA contiennent des niveaux accrus d'oligomères d'A β et peuvent agir comme véhicules pour le transfert de neurone à neurone de ces espèces toxiques dans les neurones receveurs en culture (Sardar Sinha et al., 2018).

Il est possible qu'une partie de la réponse quant à l'hétérogénéité observée dans la MA puisse venir de la présence de souches distinctes d'A β prion dans le cerveau. Il a été montré qu'il existe

de nombreuses espèces d'oligomères d'A β avec des taux de propagation différents et une toxicité distincte dans la pathogenèse de la MA (Musiek and Holtzman, 2015; Sengupta et al., 2016). En effet, les agrégats d'A β présents chez les patients atteints de MA sont structurellement distincts de ceux formés spontanément à partir d'A β synthétiques (Paravastu et al., 2009). Il a été déterminé que les agrégats d'A β isolés de deux patients atteints de MA sporadique différents produisent des agrégats d'A β et une structure et des propriétés différentes, faisant valoir que des souches distinctes d'A β peuvent exister chez les patients atteints de MA (Lu et al., 2013a). En effet, les peptides A β 1-42 qui s'agrègent chez les patients avec une version plus agressive de la MA sont conformationnellement distincts de ceux présents chez les patients atteints de MA avec une évolution de la maladie stéréotypée (Cohen et al., 2015). Il a été montré que la souche d'A β qui s'agrège à partir d'un patient atteint de MA avec la mutation suédoise de l'APP peut être distingué de celle présente dans un patient MA possédant la mutation arctique (E693G) (Watts et al., 2014). De plus, quand les extraits de cerveau de ces deux patients ont été inoculés à des souris APP23, des pathologies A β distinctes ont été observées (Watts and Prusiner, 2018).

3.3.4 Propriétés des autres catabolites de l'APP

Les rôles des principaux autres produits de dégradation de l'APP sont résumés dans le tableau suivant :

	Propriétés neuroprotectrices	Propriétés neurotoxiques	
sAPPα	- Améliore la survie neuronale - Protège contre les dommages hypoglycémiques - Protège contre l'excitotoxicité du glutamate - Atténue les dommages induits par Aβ - Protège contre les lésions oxydatives - Diminue les niveaux élevés de calcium intracellulaire - Facilite la LTP et améliore la mémorisation - Stimule la prolifération de cellules souches - Régule la fonction de l'APP dans la croissance des neurites	- Favorise une croissance cellulaire incontrôlée (tumorigénèse) - Stimule l'activation de la microglie - Induit la production de cytokines pro-inflammatoires	Araki et al., 1991 Mattson et al., 1993 Goodman and Mattson, 1994 Caillé et al., 2004 Young-Pearse et al., 2008 Ohsawa et al., 1999 Ishida et al., 1997 Taylor et al., 2008 Barger and Harmon, 1997 Meziane et al., 1998
sAPPβ	- Similaire à sAPPα avec une efficacité 100 fois moindre	- Active DR-6, un récepteur cytoplasmique de mort cellulaire, pour induire la neurodégénérescence	Freude et al., 2011 Chasseigneaux and Allinquant, 2012 Chasseigneaux et al., 2011 Nikolaev et al., 2009
APP-CTFα	- Fait pencher le système vers la voie non-amyloïdogénique, peu de données à ce jour	- Aucune connue	Nhan et al., 2015 Müller et al., 2017
APP-CTFβ	- Aucune connue	- Altère le fonctionnement du système autophagique - Neurotoxique, altère les fonctions synaptiques - Perturbe l'homéostasie des canaux ioniques - Favorise l'astroglie - Perturbe la LTP et les fonctions cognitives	Lauritzen et al., 2016 Tamaye et al., 2012 Song et al., 1998 Nalbantoglu et al., 1997 Berger-Sweeney et al., 1999
AICD	- Médiateur de certaines activités transcriptionnelles	- Pro-apoptotique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> - Active la Gsk3-β qui augmente la phosphorylation de Tau - Induit la dégénérescence des neurones hippocampiques	Cao and Südhof, 2001 Pardossi-Piquard and Checler, 2012 Bukhari et al., 2017 Kim et al., 2003 Kinoshita et al., 2002

		- Induit une activité neuronale aberrante et des troubles cognitifs	Chang et al., 2006 Ozaki et al., 2006 Nakayama et al., 2008 Ohkawara et al., 2011
p3	- Aucune connue	- Induit l'apoptose <i>in vitro</i> - Favorise la réponse inflammatoire	Wei et al., 2002 Szczepanik et al., 2001
Jcasp	- Aucune connue	- Pro-apoptotique	Bertrand et al., 2001 Madeira et al., 2005
C31	- Aucune connue	- Induit un dysfonctionnement synaptique - Pro-apoptotique	Lu et al., 2003 Park et al., 2009

Figure 16 : **Tableau récapitulatif des effets neurotrophiques et neurotoxiques des principaux fragments issus du clivage de l'APP.**

IV. Les protéases BACE

3.4.1 Structure des protéases BACE

En 1999, quatre groupes ont indépendamment reporté l'identification d'une aspartyl protéase membranaire, la β -secrétase, appelée également BACE ou Memapsin2 (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE1 est responsable de l'étape initiale et limitante de la production du peptide A β , qui est le clivage à l'acide aminé Asp1 de la séquence A β (Vassar et al., 2014). C'est une aspartyl protéase transmembranaire de type I avec un prodomaine N-terminal de 21 résidus, un grand domaine luminal de 434 résidus, un domaine transmembranaire de 21 résidus et une queue cytoplasmique de 24 résidus (Zhi et al., 2011) (Figure 17). Elle possède un site actif dans son domaine luminal avec des résidus acide aspartique dans les deux motifs, DTGS (résidus 93-96) et DSGT (résidus 289-292). BACE1 est synthétisée en tant que protéine précurseur puis transportée à travers la voie sécrétoire : elle subit une maturation par N-glycosylation complexe et élimination protéolytique du pro-peptide par une endoprotéase de type furine, pour aboutir à une protéine mature de 75 kDa (Capell et al., 2000; Haniu et al., 2000; Creemers et al., 2001).

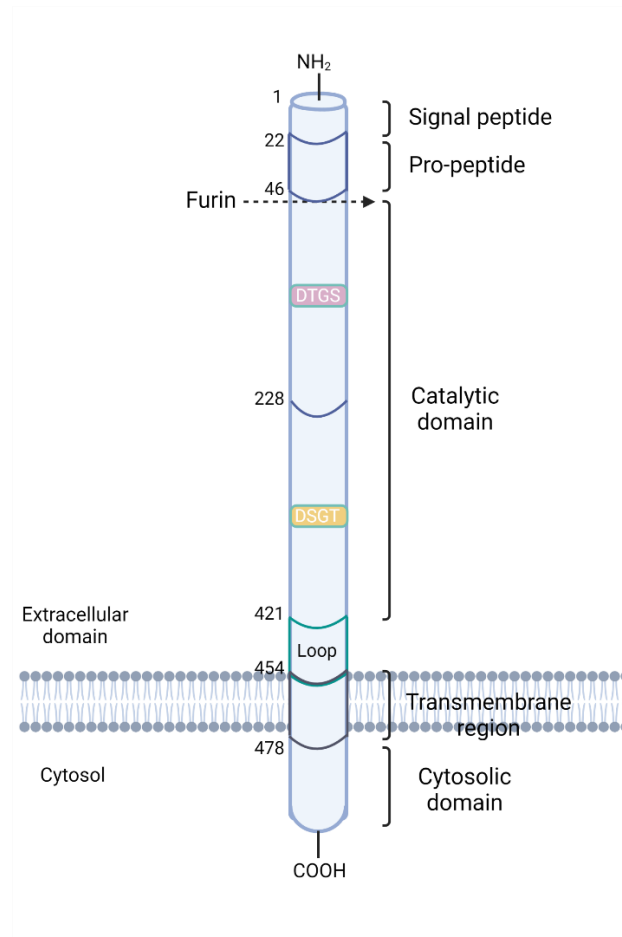


Figure 17: **Caractéristiques structurales de la protéase BACE1.** BACE1 est une aspartyl protéase transmembranaire de type I qui se compose de 501 acides aminés et sur laquelle se répartissent un domaine N-terminal comprenant un peptide signal et un pro-peptide, qui vont être clivés par la Furine pour activer BACE1, ainsi que du domaine cytosolique. En C-terminal on retrouve une structure en hélices, la région trans-membranaire et le domaine cytosolique. BACE1 possède également deux motifs de site actif de protéase aspartique, DTGS (résidus 93-96) et DSGT (résidus 289-292), et la mutation de l'un ou l'autre de ces motifs rend l'enzyme inactive. Adapté de Moussa-Pacha et al., 2020.

3.4.2 Fonctions des protéases BACE

BACE1 est la principale β -secrétase du cerveau (Vassar et al., 1999), tandis que l'expression et la fonction de son homologue BACE2 (codée par un gène sur le chromosome 21) restent encore peu connues (Vassar et al., 2014; Yan, 2017). Au moins trois activités différentes de BACE2 ont été mise en évidence en ce qui concerne son interaction avec l'APP : en tant que θ -secrétase (dégradant les β -CTF et empêchant la formation de $A\beta$), en tant que β -secrétase auxiliaire (pro-amyloïdogène), et en tant que protéase dégradant les peptides $A\beta$ synthétiques (Fluhrer et al., 2002; Shi et al., 2003; Sun et al., 2006; Abdul-Hay et al., 2012).

La glycosylation de BACE1 semble être une étape importante pour l'activité maximale de l'enzyme, les mutations des sites de glycosylation réduisant considérablement son activité protéolytique (Charlwood et al., 2001). La protéine BACE1 mature est ensuite transportée vers la surface cellulaire, d'où elle peut être réinternalisée dans les compartiments endosomaux (Huse et al., 2000). En cohérence avec la localisation subcellulaire de BACE1, le clivage de l'APP par la β -secrétase a été identifié dans le réseau trans-golgi (TGN) et les compartiments endosomaux ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique (Vassar and Citron, 2000; Yan et al., 2001; Rajendran et al., 2006). Comme les autres aspartyl protéases, BACE1 nécessite un environnement acide pour une activité optimale. De plus, BACE1 soluble est incapable de cliver efficacement l'APP, ce qui indique que BACE1 doit être lié à la membrane et à proximité de l'APP pour que le clivage se produise (Yan et al., 2001).

BACE1, via le motif di-leucine dans sa partie cytoplasmique qui peut se lier au complexe protéique adaptateur clathrine-2 (AP-2), est internalisée de la membrane plasmique aux endosomes précoces (Prabhu et al., 2012; Buggia-Prévot et al., 2013; Chia et al., 2013). L'APP nouvellement synthétisée quant à elle est directement transportée du TGN vers les endosomes précoces (Burgos et al., 2010; Toh and Gleeson, 2016). Par conséquent, les endosomes précoces sont un site de convergence important pour APP et BACE1 (Koo et al., 1996; Kinoshita et al., 2003; Rajendran et al., 2006; Lorenzen et al., 2010). À partir des endosomes précoces, le trafic intracellulaire de BACE1 et APP diverge et APP est acheminée le long de la voie endolysosomale pour dégradation tandis que BACE1 est transportée vers les endosomes de recyclage avant d'être recyclée à la surface cellulaire. Le trafic normal de BACE1 et de l'APP conduit en conditions physiologiques à de faibles niveaux de clivage de l'APP en raison des différentes voies de trafic intracellulaire de la protéine APP et de BACE1. Le niveau de production d'A β dépend donc de la répartition de l'APP et de BACE1 dans leurs voies de trafic respectives. Dans les neurones, BACE1 et APP sont séparés en conditions de repos, tandis que l'activité neuronale induit leur convergence dans les endosomes précoces et tardifs (Das et al., 2013), fournissant un environnement optimal pour l'activité enzymatique de BACE1 et le clivage de l'APP (Huse et al., 2000).

Le transport intracellulaire de BACE1 est régulé notamment par la phosphorylation de son domaine cytoplasmique par la caséine kinase-1 (Walter et al., 2001; Pastorino et al., 2002). La phosphorylation de BACE1 affecte également son interaction avec la protéine GGA1, qui permet de faire transiter BACE1 rapidement des endosomes précoces (lieu de rencontre privilégié entre BACE et APP) aux endosomes de recyclage, ce qui limite la génération d'A β .

L'expression de GGA1 est diminuée dans la MA (Dell'Angelica et al., 2000; Hirst et al., 2000; He et al., 2003; Shiba et al., 2004; von Arnim et al., 2006). Il a également été démontré que plusieurs autres protéines pourraient participer au trafic de BACE1 telles que SNX3, SNX4, Rab4, Rab11, Rab22, la protéine membranaire associée aux vésicules 3 (Vamp3) et Arf6 (Toh and Gleeson, 2016).

La quantité d'A β générée semble donc dépendre de plusieurs facteurs : de l'équilibre entre le clivage α - et β -secrétase de l'APP (Nitsch et al., 1996), de la localisation subcellulaire respective de BACE1 et de l'APP (Lee et al., 2005), et enfin dans quelle mesure l'APP va subir un clivage par BACE1 pour produire le peptide A β .

Il a été démontré que la synthèse de la protéine BACE1 est augmentée dans le cerveau des patients atteints de la MA, et que cette élévation est corrélée avec la production d'A β et la présence accrue de plaques amyloïdes (Yang et al., 2003; Li et al., 2004). Cette constatation a été confirmée dans le cerveau de souris double transgéniques surexprimant la protéine BACE et l'APP (Willem et al., 2004; Rockenstein et al., 2005). De manière réciproque, les souris transgéniques KO pour le gène de BACE ne développent pas de plaques amyloïdes (Luo, 2003). Peut-être en tant que réponse pathologique à l'A β , BACE1 s'accumule à proximité des plaques amyloïdes, ce qui augmente la génération locale d'A β (Zhao et al., 2007; Kandalepas et al., 2013; Sadleir et al., 2014, 2016). Cependant, une activité excessive de BACE1 peut également conduire à un clivage alternatif de l'APP au site β' , juste après l'acide glutamique-11 (Glu11) dans la séquence du peptide A β (Vassar et al., 1999). Ce clivage entraîne la libération d'un fragment sAPP β' et d'un APP-CTF β' (ou C89) transmembranaire (Huse et al., 2002). La γ -secrétase clive ensuite le C89 en peptide A β 11-x, variant de 34 à 50 acides aminés (environ 4 kDa) sécrété dans le milieu extracellulaire (van der Kant and Goldstein, 2015; Kimura et al., 2016). Cette activité excessive de BACE1 peut aussi entraîner une dégradation du peptide A β , en catalysant la troncature C-terminale de A β 1-40 et A β 1-42 en peptide non-amyloïdogène A β 34 (Liebsch et al., 2019).

3.4.3 Autres substrats et inhibiteurs de BACE1

La suppression de BACE1 dans un modèle de souris transgéniques est effectivement capable d'inverser complètement le dépôt d'amyloïde, mais les souris avec une ablation de BACE1 présentent également un nombre alarmant de défauts physiologiques, tels qu'une astrogenèse anormale, une neurogenèse réduite, une altération de la croissance axonale et de l'orientation, une hyperactivité, une potentialisation à long terme altérée (LTP) et une dépression à long terme

(LTD) accrue, une hypomyélinisation, ainsi que des défauts musculaires (Vassar et al., 2014; Yan and Vassar, 2014; Barão et al., 2016; Hu et al., 2016a). Ces phénotypes semblent être liés au clivage aboli des substrats physiologiques BACE1 (Hu et al., 2018). En effet BACE1 possède de nombreux substrats cellulaires autres que l'APP, parmi lesquels : la Neuréguline 1 (NRG1), qui est impliquée dans la myélinisation axonale des neurones (Willem et al., 2006; Hu et al., 2016a), la Neuréguline 3 (NRG3), la sous-unité $\beta 2$ du canal sodique voltage-dépendant (Wong et al., 2005; Kim et al., 2007), les molécules d'adhésion et de guidage axonal, y compris CHL1 (Rajapaksha et al., 2011) et L1 (Zhou et al., 2012), Jagged 1 (Hu et al., 2013), la α -2,6-sialyltransférase (Kitazume et al., 2005; Sugimoto et al., 2007), les protéines APP homologues APLP1 et APLP2 (Li and Südhof, 2004), la protéine liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité (LRP) (von Arnim et al., 2005), le récepteur à l'interleukine-1 de type II (IL-1R2) (Kuhn et al., 2007, 2012), et le vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) (Cai et al., 2012). Certaines études démontrent même que l'affinité de BACE1 est plus importante pour ses substrats non amyloïdogéniques que pour l'APP (Ben Halima et al., 2016). Par conséquent, les approches thérapeutiques basées sur des inhibiteurs de BACE1 afin de réduire la production d'A β posent des problèmes importants liés aux effets secondaires de l'interférence du traitement avec ces substrats supplémentaires.

Plusieurs inhibiteurs de BACE ont néanmoins été découverts comme le Gleevec (Netzer et al., 2017) et plusieurs autres inhibiteurs chimiques (les molécules inhibitrices de BACE1 en phase d'essais cliniques sont détaillées au Chapitre 5.I). Il a également été mis en évidence plusieurs facteurs intracellulaires capables d'inhiber BACE1, tels que sAPP α , le produit du clivage de l'APP par l' α -secrétase, qui est un puissant inhibiteur endogène direct de BACE1, probablement grâce à un mécanisme allostérique empêchant l'interaction BACE1/APP (Peters-Libeux et al., 2015). La leptine réduit aussi la production d'A β et diminue l'activité et les niveaux de synthèse de BACE1 : la leptine augmente les niveaux d'expression et l'activité du régulateur métabolique SIRT1, ce qui entraîne par la suite une diminution de l'expression de BACE1 médiée par NF- κ B (Marwarha et al., 2014).

V. Mutations et pathologies associées

Le gène *APP* est sujet à de nombreuses mutations dans sa séquence. En effet, il existe plus d'une soixantaine de mutations du gène *APP* recensées à ce jour, certaines aggravant et d'autres

protégeant de la MA (source : Alzforum)(Figure 18). Mais en majorité les mutations codantes dans le gène *APP* entraînent une MA autosomique dominante avec un début précoce. Un certain nombre de mutations associées à la MA d'origine génétique induisant des changements dans le traitement de l'APP et entraînant une production accrue d'A β ont été caractérisées. Les plus notables d'entre elles sont la mutation KM670/671NL (mutation Suédoise) et les mutations sur la valine 717, y compris V717I (mutation de Londres) et V717F (mutation Indiana) qui encadrent la séquence du peptide A β (Mullan et al., 1992). La double mutation Suédoise au site de clivage de la β -secrétase entraîne une augmentation de six à huit fois des niveaux de peptide A β sécrété par rapport à la protéine APP native. La mutation Suédoise augmente également les niveaux d'A β 11-40/42 grâce à une production accrue de C99 (Liu et al., 2006). D'autres mutations d'*APP* associées à la MA d'origine génétique incluent : A692G (Flamande), E693G (Arctique), E693K (Italienne), D694N (Iowa) et E693Q (Néerlandaise) (Levy et al., 1990; Van Broeckhoven et al., 1990; Hendriks et al., 1992; Grabowski et al., 2001; Nilsberth et al., 2001; Bugiani et al., 2010). Alors que la mutation flamande induit une multiplication par deux de la production d'A β 40 et d'A β 42 en raison d'une activité α -secrétase réduite, les mutations néerlandaise et Iowa ne modifient pas les niveaux d'A β 40 et d'A β 42 par rapport à l'APP native, mais sont associées à une formation accélérée de fibrilles et à une pathogénicité accrue des peptides A β résultants (MacLeod et al., 2015). Les remplacements au niveau ou à proximité des sites protéolytiques β et γ semblent entraîner une surproduction d'A β ou un changement du rapport A β 40/A β 42 vers la formation du peptide A β 42 plus toxique, alors que les substitutions au sein de la séquence du peptide A β entraînent plutôt la formation d'espèces A β avec une propension accrue à l'agrégation (St George-Hyslop, 2000). La cause de la MA ne serait pas simplement l'activation de la β -secrétase et sa production d'A β , mais plutôt une modification de la quantité d'APP traitée par la β -secrétase. Cela pourrait être dû à des mutations qui réduisent le clivage par la α -secrétase, favorisant plutôt la β -secrétase, comme on peut le voir dans les cas de MA familiale.

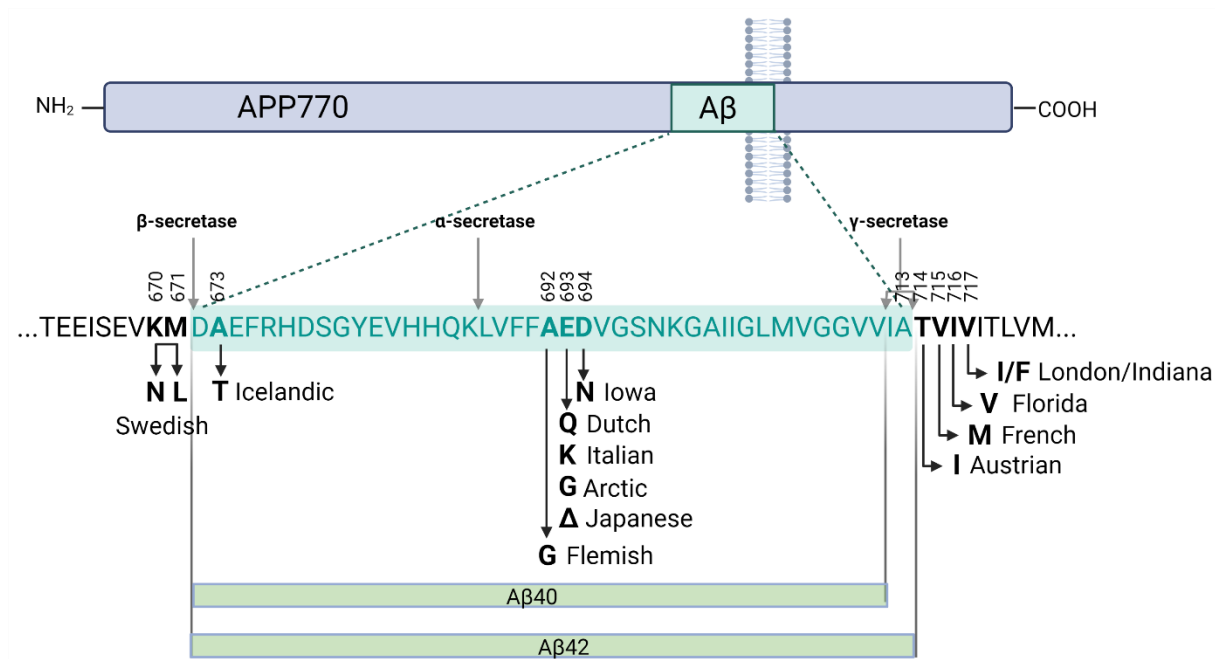


Figure 18 : **Représentation schématique de la protéine précurseur d'amyloïde (APP), avec la séquence du peptide Aβ, et les sites de clivages α-, β- et γ-sécrétase.** Sont détaillés ici les substitutions d'acides aminés pathologiques ou protectrices (Islandaise) causant la MA au sein de l'APP et le nom de la mutation associée suivant l'isoforme la plus longue, APP770. Modifié d'après Kumar-Singh, 2009.

A l'inverse, Jonsson et collaborateurs ont mis en évidence en 2012 une mutation codante (A673T) dans le gène *APP* qui protégerait contre le déclin cognitif chez les personnes âgées sans maladie d'Alzheimer (Jonsson et al., 2012). Cette substitution est adjacente au site de clivage β de BACE1 dans l'APP, et entraîne une réduction d'environ 40 % de la formation de peptides amyloïdogènes *in vitro*. L'allèle A673T ou mutation islandaise conférerait ainsi une protection contre le développement de la MA.

Chapitre 4 : Le peptide amyloïde-β et la protéine Tau au carrefour de la maladie d'Alzheimer

I. Dégradation de Tau et de l'APP : systèmes autophagiques

4.1.1 Les systèmes de dégradation cellulaire

L'autophagie est un terme englobant un certain nombre de voies cataboliques qui régulent l'homéostasie cellulaire via la dégradation lysosomale et le recyclage des composants

cytoplasmiques, tels que les organites endommagés ou indésirables, les agrégats de protéines ainsi que les agents pathogènes. Les trois principaux sous-types d'autophagie sont la microautophagie (internalisation directe de composants cytosoliques via l'invagination de la membrane du lysosome), l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes ou CMA (recrutement médié par des protéines chaperonnes via des séquences polypeptidiques de type KFERQ vers le lysosome) et la macroautophagie, caractérisée par la formation autour des agrégats de protéines, des organites endommagés ou des pathogènes d'une structure à double membrane appelée autophagosome, qui va fusionner avec le lysosome (Figure 19). Les lysosomes sont des compartiments à membrane unique remplis d'enzymes hydrolytiques acides (par exemple, les cathepsines) qui digèrent les macromolécules et les organites d'origine externe et interne.

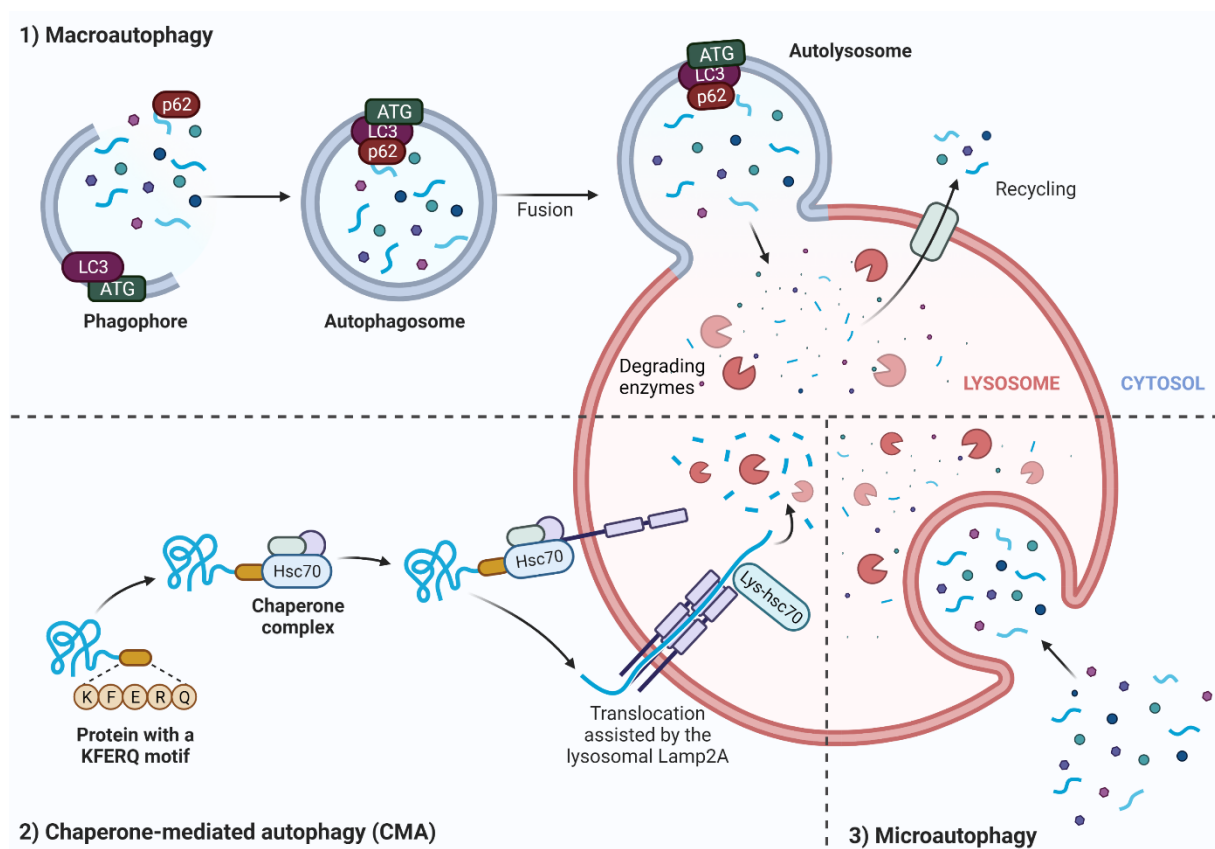


Figure 19 : Les trois types d'autophagie : la macroautophagie (1), l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (2) et la microautophagie (3), et leur contribution à la dégradation des protéines et à l'élimination des organites dans les neurones. Dans la macroautophagie, les substrats sont séquestrés dans une membrane appelée phagophore, qui s'allonge formant une double structure membranaire, l'autophagosome. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec le lysosome pour former des autolysosomes. En revanche, la CMA implique la protéine chaperonne Hsc70 et ses co-chaperons qui reconnaissent et déplient les protéines substrats, puis se lient à la protéine lysosomale Lamp2A et sont transloqués à travers la membrane lysosomale pour être dégradés. Dans la microautophagie, les invaginations de la membrane lysosomale englobent directement des portions du cytoplasme.

La macroautophagie, la principale voie de dégradation lysosomale dans les cellules, est responsable de l'élimination des constituants cytoplasmiques à longue durée de vie et dégrade la plupart des organites cellulaires et des agrégats de protéines trop gros pour être dégradés par le protéasome (Rubinsztein, 2006; Mizushima, 2007; Xie and Klionsky, 2007). Les substrats de la macroautophagie sont reconnus par les récepteurs sélectifs de l'autophagie comme p62/SQSTM1 (séquestosome-1), qui se lie aux protéines ATG ancrées à la membrane interne de l'autophagosome, via une interaction avec LC3 (Knaevelsrud and Simonsen, 2010; Johansen and Lamark, 2020). La formation d'autophagosomes est induite par l'inhibition de mTOR (cible mammifère de la rapamycine) (Schmelzle and Hall, 2000) ou de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Samari and Seglen, 1998). Les autophagosomes et leur contenu sont éliminés lors de la fusion avec les lysosomes contenant des cathepsines, d'autres hydrolases acides et une ATPase vacuolaire (v-ATPase) (Yamamoto et al., 1998), une pompe à protons qui acidifie l'autolysosome nouvellement créé. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes mais également avec les endosomes tardifs pour former respectivement des autolysosomes et des amphisomes. Les protéines de transport, telles que les dynéines, sont impliquées dans le mouvement des autophagosomes le long des microtubules vers les lysosomes ou les endosomes tardifs.

L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) est une voie de dégradation sélective des protéines par les lysosomes (Kaushik and Cuervo, 2018). Le ciblage lysosomal est déclenché lorsque la protéine chaperonne cytosolique de choc thermique de 70 kDa (Hsc70) reconnaît un pentapeptide (le motif de type KFERQ) dans la séquence d'une protéine. Une fois au niveau du lysosome, le complexe protéine/chaperonne se lie à la queue cytosolique de la protéine membranaire associée au lysosome de type 2A (Lamp2A), ce qui déclenche la multimérisation de Lamp2A en un complexe de translocation pour internaliser la protéine taggée dans les lysosomes. Lamp2A est la seule isoforme des trois variantes protéiques épissées du gène *Lamp2* qui participe à la CMA (Gough et al., 1995; Cuervo and Dice, 2000). Les lysosomes dégradent les cargos (de grosses protéines, de durée de vie longue ou des organelles endommagées) qui leur sont délivrés par la voie d'autophagie ou la voie d'endocytose.

La majorité des protéines cytosoliques chez les eucaryotes sont dégradées via l'UPS (système Ubiquitine/Protéasome). Le système UPS ou le protéasome (26S) prend en charge la dégradation des protéines de durée de vie courte, qui sont ensuite recyclées en acides aminés. Dans ce processus, les protéines ciblées pour la dégradation sont marquées par des multimères d'une protéine de 76 acides aminés très conservée au cours de l'évolution appelée Ubiquitine,

puis sont dégradées par le Protéasome 26S, une protéase cytosolique géante, retrouvée dans toutes les cellules (Nam et al., 2017). L'Ubiquitine est liée de manière covalente à la protéine cible par une liaison isopeptidique entre la glycine carboxy-terminale de l'Ubiquitine et, habituellement, le groupe -amino de la lysine dans la protéine cible. L'UPS est impliquée à de nombreux niveaux dans l'homéostasie cellulaire, notamment dans la régulation du cycle cellulaire, la réponse inflammatoire et immunitaire, la survie cellulaire ou la dégradation associée au réticulum endoplasmique (Nandi et al., 2006). Il a été montré que p62 opère également au sein de l'UPS, faisant passer les cargos protéiques polyubiquitylés vers la dégradation protéasomale ou vers la formation d'inclusions intracellulaires stables. p62 sert à moduler les signaux de cytokines médiés par l'Ubiquitine tels que NF- κ B, TNF- α et la Caspase-8, avec des implications sur la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose (Trejo-Lopez et al., 2020).

Toutes les cellules s'appuient sur leurs systèmes de vigilance intracellulaire évolutivement conservés pour maintenir l'homéostasie protéique. Cette adaptation aux stress extrinsèques (environnementaux) et intrinsèques (métaboliques) est particulièrement importante dans les neurones qui, en raison de leur statut hautement différencié, sont très sensibles aux agressions protéotoxiques (Nixon, 2013). Il a été établi que la présence d'agrégats de protéines est une caractéristique commune dans le cerveau des patients atteints de maladies neurodégénératives (Bourdenx et al., 2017). Fait intéressant, la plupart des cerveaux âgés présentent également une agrégation de protéines, même en l'absence de maladie (Nixon, 2013). L'altération de l'autophagie, l'une des composantes de l'homéostasie protéique, est associée au vieillissement et aux maladies neurodégénératives, dont la MA (Menzies et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Scrivo et al., 2018). Au fil du temps, l'échec progressif des mécanismes de réparation cellulaire conduit à une détérioration des fonctions neuronales en raison de l'accumulation de dommages moléculaires et cellulaires. Il a également été constaté que la capacité de la cellule à dégrader correctement les protéines diminuait avec l'âge, ce qui peut contribuer au processus de vieillissement et entraîner des maladies liées à l'âge dans le SNC (Corti et al., 2020). La macroautophagie notamment a été démontrée comme étant nécessaire au maintien de l'homéostasie protéique neuronale et à la protection contre la neurodégénérescence (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Le dysfonctionnement progressif des lysosomes dans la MA est multifactoriel, impliquant une surcharge protéique due à une accélération de l'autophagie, des gènes liés à la MA (par exemple, *PICALM*, *GRN* et *BIN1*), des dommages oxydatifs liés au vieillissement et à la maladie qui crée des protéines plus résistantes à la dégradation, et la

génération de radicaux libres à partir de la peroxydation du cholestérol et d'autres lipides (Gamba et al., 2015; Giudetti et al., 2016). Les anomalies du système autophagique sont marquées notamment par des endosomes agrandis, une accumulation progressive de lysosomes et de vacuoles autophagiques et un défaut d'intégrité de la membrane lysosomale qui sont des caractéristiques neuropathologiques précoces bien connues de la MA (Nixon et al., 2005; Nixon, 2013; Piras et al., 2016; Menzies et al., 2017). Des défauts dans le transport rétrograde des autophagosomes de l'axone au soma et le transport antérograde des lysosomes dégradants leur contenu vers les axones distaux ont également été démontrés (Farfel-Becker et al., 2019). Les lysosomes dysfonctionnels peuvent laisser échapper des cathepsines dans le cytoplasme, ce qui active finalement des programmes de mort cellulaire qui sont médiés par la libération de caspases, de calpaïnes et d'hydrolases lysosomales. La compromission des lysosomes peut perturber les fonctions neuronales de manière imperceptible ou pathologique et peut expliquer le large éventail de caractéristiques phénotypiques dans une maladie neurodégénérative donnée (Kroemer and Jäättelä, 2005; Nixon, 2017).

Il a été suggéré que les oligomères ou agrégats de protéines mal repliées étaient particulièrement toxiques pour les neurones, et altéraient le repliement correct des protéines physiologiques en séquestrant les chaperonnes et d'autres facteurs, conduisant à une altération de l'homéostasie des protéines et des systèmes de dégradation (Takalo et al., 2013). Une activation compensatoire des lysosomes suite à cette accumulation de protéines se met alors en place (Bendiske and Bahr, 2003), mais l'accumulation anormale de protéines va finir par submerger ces systèmes et, par conséquent, davantage de protéines vont s'amasser dans la cellule dans un cercle vicieux, mettant en péril à terme la survie de la cellule. De plus, les protéines agrégées ne peuvent généralement pas être dégradées par l'UPS, déplaçant le fardeau de leur clairance vers les systèmes autophagiques, les formes oligomères des protéines mal repliées ne pouvant pas traverser l'entrée étroite du protéasome (Bence et al., 2001; Frake et al., 2015). Si une protéine mal repliée ne peut être dégradée ni par le protéasome ni par les systèmes autophagiques, elle va être séquestrée vers un site cellulaire spécifique et générer par un mécanisme cytoprotecteur une inclusion intracellulaire, nommée aggresome (Kopito, 2000).

4.1.2 Les voies de dégradation de la protéine Tau

Il a été démontré que de nombreuses protéases contribuaient à la dégradation de la protéine Tau, notamment la calpaïne (Xie and Johnson, 1998; Liu et al., 2010), les aminopeptidases

(Sengupta et al., 2006), la thrombine (Olesen, 1994), la sérine protéase HTRA1 (Tennstaedt et al., 2012), et les caspases (Fasulo et al., 2002). Cependant, ces enzymes ne semblent pas être principalement responsables de la clairance de Tau. Au lieu de cela, elles sont capables de générer des espèces de Tau modifiées qui peuvent contribuer à une clairance améliorée de Tau ou au développement d'une tauopathie, voire aux deux. Certains de ces fragments, tels que ceux générés par la Thrombine, la Calpaïne et la Caspase, sont potentiellement toxiques pour la cellule s'ils s'accumulent en raison de mécanismes de clairance inefficaces (Chesser et al., 2013). La majeure partie de la clairance des formes physiologiques et pathologiques de Tau est plutôt médiée par les systèmes de dégradation protéasomale et autophagique. La Tau neurotoxique soluble est éliminée par l'UPS (Lee et al., 2013), CMA (Wang et al., 2009a) et la microautophagie (Caballero et al., 2018), tandis que la Tau insoluble intracellulaire est dégradée par la macroautophagie (Krüger et al., 2012).

Le protéasome est connu pour jouer un rôle important dans la dégradation de la protéine Tau (David et al., 2002; Lee et al., 2013). En effet, la Tau agrégée présente dans les NFT est fortement ubiquitinylée (Mori et al., 1987; Perry et al., 1987). Cela suggère que les protéines Tau anormales ont été détectées et marquées pour dégradation, mais en raison d'une clairance inefficace ou altérée, elles restent dans les cellules et se déposent en inclusions (Ross and Poirier, 2004). Il a également été démontré que la Tau phosphorylée inhibe la fonction du protéasome (Keck et al., 2003; Myeku et al., 2016), et que cette inhibition du protéasome entraîne la formation accélérée d'inclusions de Tau (Goldbaum et al., 2003; Tan et al., 2008; Drummond et al., 2020).

La CMA contribue également à la dégradation de Tau (Cuervo, 2004; Caballero et al., 2018). Les variantes pathogènes de Tau portant des mutations ou modifications post-traductionnelles aberrantes sont aussi prises en charge par la CMA mais elles finissent par bloquer la voie lysosomale (Cuervo, 2004; Wolfe et al., 2013; Caballero et al., 2018). Une différence notable est que l'activation compensatoire de la macroautophagie observée dans d'autres cellules lors du blocage de la CMA ne se produit pas dans les neurones. Alors que la macroautophagie peut directement séquestrer et dégrader les inclusions protéiques (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006), seules les protéines solubles peuvent être dégradées par la CMA (Salvador et al., 2000; Bourdenx et al., 2021). Tau est également dégradée par une forme sélective de microautophagie nommée microautophagie endosomale (e-MI), qui reconnaît les cargos abritant des motifs KFERQ à l'aide de la protéine Hsc70 et les délivre dans les endosomes tardifs (Sahu et al., 2011). L'e-MI régule le renouvellement des protéines synaptiques anciennes et endommagées

et la libération des neurotransmetteurs (Uytterhoeven et al., 2015). De manière intéressante, Tau possède deux motifs KFERQ, et l'induction de la microautophagie réduit les niveaux de Tau et la séquestration des vésicules synaptiques à la terminaison pré-synaptique dans les neurones de drosophile.

A l'appui de ces études, le traitement de tranches d'hippocampe avec de la chloroquine, qui augmente le pH des lysosomes et altère leur fonction, a été associé à une diminution significative de la dégradation de Tau et a provoqué son accumulation (Hamano et al., 2008). A l'inverse, l'activation de l'autophagie avec du tréhalose ou du bleu de méthylène dans des modèles de rongeurs a permis de diminuer les niveaux de Tau totale et hyperphosphorylée (Congdon et al., 2012; Krüger et al., 2012).

Par ailleurs, plusieurs protéines sont connues pour moduler la dégradation de la protéine Tau via les systèmes autophagiques, tels que BAG3 et la synaptopodine, qui mettent en place un mécanisme de régulation de l'autophagie post-synaptique pour faciliter l'élimination des espèces de MAPT phosphorylées (Ji et al., 2019). Les deux protéines coopèrent fonctionnellement pour moduler le flux d'autophagie et faciliter l'élimination de la Tau phosphorylée au niveau des épines dendritiques. Le Retromer, constitué des composants VPS35, VPS26 and VPS29, qui orchestre le tri des endosomes au Golgi et à la membrane plasmique de nombreux récepteurs transmembranaires, régule la dégradation et l'aggrégation de Tau via les lysosomes (Carosi et al., 2020). Parallèlement, la protéine Tau peut réguler sa propre dégradation : la dissociation de la protéine Tau hyperphosphorylée des microtubules et son désassemblage peuvent interférer avec le transport rétrograde des autophagosomes vers les lysosomes et conduire finalement à l'accumulation d'autophagosomes dans les axones (Jiang and Bhaskar, 2020). Tau peut ainsi altérer la CMA et causer un dysfonctionnement lysosomal, ce qui va conduire à l'oligomérisation de Tau et à son aggrégation (Wang et al., 2009a).

4.1.3 Les voies de dégradation de la protéine APP

Alternativement à leur clivage par la γ -secrétase, les protéases lysosomales et/ou le protéasome sont impliqués dans la dégradation des fragments issus de l'APP. Dans des conditions physiologiques, la protéine APP est majoritairement adressée aux lysosomes pour y être dégradée. En effet, il a été montré que les voies d'endocytose et d'autophagie, les principales voies du traitement de l'APP sont toutes deux régulées à la hausse dans la MA (Nixon, 2017).

En accord avec ces données, la restauration de la fonction lysosomale et du taux de renouvellement des protéines autophagiques dans un modèle de souris transgéniques de dépôt amyloïde permet d'améliorer le phénotype et de réduire la charge amyloïde (Yang et al., 2011). L'administration de rapamycine afin de stimuler l'autophagie réduit considérablement le dépôt amyloïde dans les modèles de souris surexprimant l'*APP* (Spilman et al., 2010; Tian et al., 2011), montrant que la voie endosome/lysosome est importante dans le traitement de l'*APP*. Il a également été démontré que les fragments APP-CTFs, A β et AICD sont dégradés par la voie lysosomale puisque l'inhibition des protéases lysosomales par des agents alcalinisants tels que la chloroquine ou le chlorure d'ammonium, entraîne une accumulation de ces fragments (Vingtdeux et al., 2007a, 2007b; González et al., 2017). De plus, la dérégulation de la voie endosome/lysosome et celle de l'autophagie est rapportée comme un mécanisme clé de la production des peptides A β dans la MA (Vingtdeux et al., 2007b; Ghavami et al., 2014; Peric and Annaert, 2015). L'accumulation intralysosomale d'A β et de CTF β serait même un déclencheur de la mort neuronale dans la MA (Lauritzen et al., 2012, 2016; Choi et al., 2013; Fraldi et al., 2016). L'*APP* contient un motif KFERQ à son extrémité C-terminale, ce qui la rend susceptible d'être dégradée par la CMA. La suppression de ce motif KFERQ augmente les fragments C-terminaux (CTF), suggérant que ce motif est important pour le traitement normal et la dégradation de l'*APP* pour empêcher l'accumulation d'APP-CTF (Park et al., 2016).

Le peptide A β quant à lui peut être dégradé grâce à plusieurs protéases, notamment la protéine 1 liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité, qui transporte également l'A β à travers la BHE (Barrière hémato-encéphalique) et dans le sang (Sagare et al., 2007). Ont été caractérisées également l'Enzyme de dégradation de l'insuline (IDE), l'Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), les Enzymes de conversion de l'endothéline 1 et 2 (ECE-1 et ECE-2), la Plasmine, les Cathepsines et la Neprilysine (NEP) principalement (De Strooper, 2010; Saido and Leissring, 2012; Baranello et al., 2015). On peut également citer les MMPs comme des protéases capables de dégrader le peptide A β (Rivera, 2019). C'est cependant la NEP qui apparaît être l'enzyme la plus efficace pour dégrader l'A β (Vekrellis et al., 2000; Shirotani et al., 2001).

Il a été montré que l'inhibition du protéasome n'altère pas les niveaux d'expression de l'*APP* totale (Kienlen-Campard et al., 2006; Agholme et al., 2012). On peut donc en déduire que le protéasome ne joue pas un rôle prépondérant dans la dégradation de la protéine APP. Le protéasome semble plutôt avoir des effets indirects sur la dégradation de l'*APP* en modulant la dégradation des protéases impliquées dans son métabolisme telles que BACE1, ou les sous-

unités de la γ -secrétase A β H-1, PS1 et Nicastrine (Marambaud et al., 1998; He et al., 2006, 2007; Wang et al., 2012). Le protéasome pourrait cependant intervenir dans le clivage des APP-CTF β lorsque ceux-ci atteignent des niveaux non physiologiques : les APP-CTF produits à partir de l'APP totale endogène ou surexprimée sont principalement traités par la γ -secrétase et la voie endolysosomale, tandis qu'à l'opposé, le fragment CTF β surexprimé est principalement dégradé par le protéasome et dans une moindre mesure par la γ -secrétase (Evrard et al., 2018).

Le protéasome et la voie autophagie-lysosomes sont ainsi décrits pour intervenir dans la dégradation de la protéine Tau (Chesser et al., 2013; Ciechanover and Kwon, 2015; Correia et al., 2015) mais aussi de l'APP et de ses métabolites. Ainsi un dérèglement de ces deux voies de dégradation protéique altérerait à la fois le métabolisme de Tau et celui de l'APP. De même, les peptides A β et Tau peuvent contribuer à l'altération de ces systèmes (Cecarini et al., 2012; Abisambra et al., 2013). Ainsi, en interférant avec les processus de dégradation, les peptides A β et Tau pourraient contribuer à la pathologie l'un de l'autre et agir en synergie à la dérégulation de l'homéostasie cellulaire (Tseng et al., 2008; Piedrahita et al., 2015; Farizatto et al., 2017).

II. La synergie entre la protéine Tau et le peptide amyloïde

4.2.1 Potentialisation mutuelle des lésions

Les observations de l'évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau et amyloïde suggéreraient une synergie entre ces deux processus lésionnels. Dès 2002, Delacourte et ses collaborateurs ont mis en évidence que malgré le fait qu'il n'existe pas de chevauchement spatial entre l'agrégation d'A β et la pathologie Tau, la corrélation entre les deux pathologies est très forte si l'on compare les stades de la pathologie Tau versus la quantité moyenne d'agrégats A β 1-42 dans les aires néocorticales (Delacourte et al., 2002). Les deux pathologies semblent donc se trouver à différents endroits du cerveau mais pouvoir se potentialiser. La présence d'espèces A β pathologiques alimenterait le développement et la propagation trans-neuronale de type prion de la pathologie Tau (Price and Morris, 1999; Thal et al., 2002) : les oligomères et fibrilles d'A β accélèrent la propagation de Tau et la formation de DNF dans le cerveau des patients Alzheimer en créant des conditions facilitant son agrégation (Götz, 2001; Vasconcelos et al., 2016; Bennett et al., 2017; Vergara et al., 2019; Vogel et al., 2020). En effet,

aux premiers stades de la maladie, les oligomères d'A β provoquent une accumulation de Tau endogène dans les axones dystrophiques entourant les plaques pour créer un environnement spécifique qui facilite le recrutement rapide de cette Tau "potentialisée" en fibrilles. Les oligomères d'A β pourraient également favoriser la propagation de Tau grâce à la formation de canaux ou de pores A β dans la membrane cellulaire au travers desquels les protéines Tau recrutées entreraient (Sengupta et al., 2006; Kaye and Lasagna-Reeves, 2013; Di Scala et al., 2016). L'observation selon laquelle les espèces d'A β pathologiques solubles peuvent alimenter la pathologie Tau en l'absence de plaques amyloïdes expliquerait l'écart observé entre la localisation neuroanatomique des plaques et le développement et la propagation des lésions Tau dans la MA (Bolmont et al., 2007). Ces études fournissent ainsi une explication potentielle à la propagation de la pathologie Tau induite par A β au-delà des régions avec une pathologie Tau préexistante (cortex entorhinal et locus coeruleus).

Les dépôts d'A β sont nécessaires mais pas suffisants pour initier la cascade de transmission pathologique de Tau, car des protéines Tau mal repliées avec une certaine conformation sont aussi nécessaires pour déclencher ce processus (Musiek and Holtzman, 2015; He et al., 2018). Par conséquent, A β agirait en amont de Tau dans la pathogenèse de la MA et déclencherait la conversion de Tau d'un état anormal à un état toxique (Pooler et al., 2015), mais il existe également des preuves montrant que réciproquement, la Tau toxique augmente la toxicité d'A β via une boucle de rétroaction. En effet, l'accumulation de protéine Tau impacte la pathologie amyloïde, en exacerbant la dystrophie axonale liée à la présence de plaques amyloïde et en augmentant le dépôt d'A β . Il a été montré que les neurones déficients en Tau sont résistants à la neurotoxicité de l'A β *in vitro*, et que la réduction de la Tau endogène dans les modèles murins de MA protège de la synaptotoxicité induite par l'A β , des déficits mnésiques et diminue le traitement amyloïdogène de l'APP (Roberson et al., 2007; Leroy et al., 2012; Bright et al., 2015).

Au niveau génétique, il a récemment été démontré que l'A β en coopération avec Tau provoque une régulation négative de la transcription de certains gènes impliqués dans le bon fonctionnement synaptique (Pickett et al., 2019). En parallèle, ApoE4 exacerbe la pathologie amyloïde d'une manière dépendante de l'expression de *LRP1*, et il a été constaté que cette mutation aggrave la pathologie Tau (Rauch, 2020). Également, les mutations d'APP augmentent la Tau totale et phosphorylée, alors que les mutations sur *PSEN1* n'ont pas cet effet (Moore et al., 2015). L'inhibition de la γ -secrétase augmente les niveaux de protéine Tau intracellulaire, tandis que l'inhibition de la β -secrétase réduit la Tau intracellulaire. Ces données

démontrent que le métabolisme de l'APP régule la protéine Tau et suggèrent que la relation entre le traitement de l'APP et Tau n'est pas médiée uniquement par l'A β extracellulaire.

4.2.2 Protéine Fyn et excitotoxicité synaptique

Depuis ces vingt dernières années, un ensemble de preuves semble indiquer que les formes solubles d'A β et de Tau agissent ensemble, indépendamment de leur accumulation en plaques et enchevêtrements, pour conduire des neurones d'un état sain à un état pathologique et que les propriétés toxiques caractéristiques de l'A β nécessitent la protéine Tau. Il semblerait que la protéine Tau favorise l'excitotoxicité des peptides A β par sa fonction au niveau des synapses. La connexion de A β avec Tau implique probablement une voie de transduction du signal avec un récepteur pour A β , plusieurs molécules adaptatrices associées à ce récepteur et finalement l'activation d'une kinase phosphorylante de Tau. Les conclusions de plusieurs études montrent que cette kinase qui relie fonctionnellement A β à Tau pourrait être Fyn. Fyn est un membre de la famille des protéines tyrosine kinases Src (Thomas and Brugge, 1997), et est préférentiellement présente dans les microdomaines membranaires plasmiques enrichis en sphingolipides et en cholestérol traditionnellement appelés radeaux lipidiques (Minami et al., 2011). Ces microdomaines spécialisés jouent un rôle clé dans la signalisation et la fonction cellulaire en compartimentant et en régulant les interactions des protéines membranaires. Les oligomères d'A β se lient tout d'abord à la protéine prion cellulaire (PrP^C) à la surface des cellules neuronales avec une affinité élevée (Gomes et al., 2019), initiant une cascade pathologique convergeant vers Fyn (Laurén et al., 2009; Nygaard and Strittmatter, 2009; Um et al., 2012). La protéine Fyn activée entraîne une augmentation du nombre de récepteurs post-synaptiques au glutamate (Ittner et al., 2010) et phosphoryle les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ce qui augmente leur activité (Suzuki and Okumura-Noji, 1995; Tezuka et al., 1999; Trepanier et al., 2012), inondant les dendrites de niveaux nocifs de calcium (Ittner et al., 2010; Roberson et al., 2011). Cette excitotoxicité due au calcium provoque une surexcitation synaptique qui peut à terme endommager les sites postsynaptiques et provoquer la mort des neurones (Ittner and Ittner, 2018; Busche and Hyman, 2020) (Figure 20).

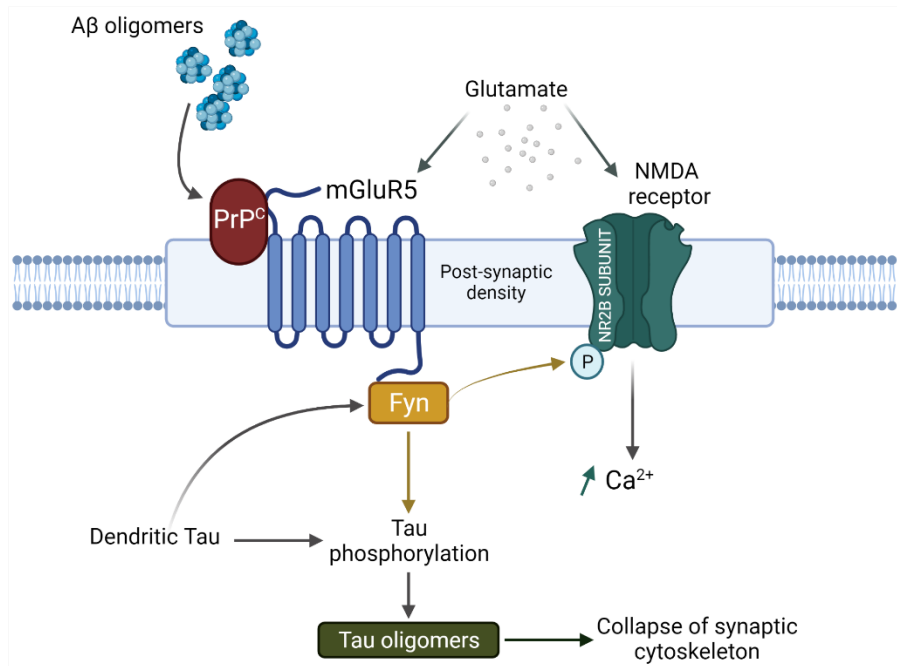


Figure 20: **Schéma illustrant l'interaction indirecte de Aβ et Tau médiée par Fyn à la synapse et le rôle central de cette kinase dans la signalisation des oligomères Aβ.** La liaison des oligomères Aβ à la protéine prion cellulaire (PrP^C) déclenche des événements de signalisation dépendants de mGluR5. Les protéines sont regroupées dans la densité post-synaptique (PSD) et modifient le fonctionnement du récepteur NMDA et les niveaux de calcium intracellulaires. La Tau joue un rôle dans la localisation de Fyn et est aussi un substrat de Fyn. La signalisation aberrante PrPC-mGluR5-Fyn entraîne un dysfonctionnement synaptique et une perte neuronale. Adapté de Penke et al., 2020.

Tau est normalement fortement enrichie dans les axones par rapport aux dendrites mais en réponse à Aβ est largement redistribuée dans le compartiment somatodendritique (Delacourte et al., 1990; Zempel et al., 2010). Tau intervient ainsi dans l'adressage de la kinase Fyn et fonctionne comme une navette intracellulaire pour augmenter le ciblage de Fyn vers le compartiment postsynaptique et stabiliser les récepteurs synaptiques nécessaires à la toxicité des peptides Aβ (Ittner and Götz, 2011). En retour, la protéine Fyn suractivée va phosphoryler la protéine Tau (Rajmohan and Reddy, 2017; Nygaard, 2018). La suractivation de Fyn induit également une élévation anormale de l'APP phosphorylée sur la Tyr682, provoquant son mauvais adressage dans les neurones, avec des conséquences importantes pour la production d'Aβ (Matrone et al., 2019). L'inhibition de l'activité de Fyn peut contrecarrer les altérations synaptiques et le déficit mnésique dans des modèles murins de la MA (Kaufman et al., 2015), démontrant davantage le lien essentiel entre la dérégulation de Fyn et les voies pathologiques de la MA.

L'excitotoxicité synaptique n'est pas le seul effet Tau-dépendant de Aβ (Rapoport et al., 2002; Nussbaum et al., 2012). Il a également été découvert dans des cultures primaires de neurones

ou des tranches de cerveau que les oligomères d'A β provoquent un désassemblage des microtubules de manière Tau-dépendante (King et al., 2006; Sadleir et al., 2016), une inhibition du transport mitochondrial le long des microtubules (Vossel et al., 2010), une potentialisation à long terme altérée, probablement par le biais de Gsk-3 β (Shipton et al., 2011) et une réentrée dans le cycle cellulaire ectopique des neurones (Seward et al., 2013), ce qui conduit à une mort neuronale massive dans la MA. Les oligomères d'A β contrôlent ainsi de nombreuses modifications post-traductionnelles de Tau (Bloom, 2014).

4.2.3 Interactions médiées par les kinases et phosphatases

Les kinases et les phosphatases sont un lien majeur dans les voies de communication entre la pathologie amyloïde et la pathologie Tau. Les données indiquent que l'amyloïde peut induire une tauopathie par l'activation de GSK-3 (Terwel et al., 2008). GSK-3 phosphoryle l'APP sur la Thr668 et cette phosphorylation du domaine intracellulaire de l'APP (AICD) est essentielle pour sa liaison à Fe65 (Chang et al., 2006). L'AICD exerce ensuite une toxicité via des mécanismes dépendant de la transcription en formant un complexe avec Fe65 dans le noyau, induisant l'expression de GSK-3, suivie d'une phosphorylation de Tau qui en retour régule l'activité de GSK-3, contribuant à la pathogenèse de la MA (Kim et al., 2003; Vossel et al., 2015). Mais de plus en plus de preuves suggèrent que la relation entre GSK-3 et A β est bidirectionnelle. Par exemple, une activité élevée de GSK-3 peut interférer avec le traitement normal de l'APP via la modulation de la fonction de la γ -secrétase, conduisant à l'accumulation d'A β (Phiel et al., 2003; Hooper et al., 2008). De même, il a été démontré que l'inhibition de GSK-3 réduit l'expression de BACE1 et donc diminue le clivage de la β -secrétase et la production d'A β (Ly et al., 2013).

La kinase 5 dépendante de la cycline (CDK5) est également intimement associée au processus de la pathogenèse de la MA. CDK5 augmente le traitement amyloïdogénique de l'APP pour générer des peptides A β en améliorant la transcription de BACE1 via la phosphorylation de STAT3. CDK5, en tant que kinase majeure de Tau, est impliquée dans de nombreux processus de phosphorylation de Tau (Liu et al., 2016). L'accumulation d'A β , en augmentant les concentrations intracellulaires neuronales de calcium, active la protéase calpaïne. La calpaïne clive p35 pour générer le fragment p25. Ce dernier a une demi-vie plus longue et une localisation subcellulaire différente de p35 et provoque une activation prolongée ainsi qu'une

localisation aberrante de l'activité CDK5. Cette dérégulation de son activité permet à CDK5 d'hyperphosphoryler ses substrats, dont la protéine Tau. L'hyperphosphorylation de Tau provoque ensuite une perturbation du cytosquelette neuronal et conduit finalement à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (Lee et al., 2003).

L'inactivation de PP2A, la principale phosphatase de Tau, est également impliquée dans la phosphorylation Thr668 de la protéine APP et dans la surproduction consécutive d'A β (Sontag et al., 2007). La méthylation de PP2A est diminuée dans la MA : les perturbations de la méthylation de PP2A compromettent la distribution de Fyn dans les radeaux lipidiques, et sa fonction dans la neuritogenèse et la régulation de l'APP (Taleski et al., 2021a). CIP2A, une oncoprotéine inhibitrice endogène de PP2A, est quant à elle surexprimée dans le cerveau des patients Alzheimer. L'inhibition de PP2A médiée par CIP2A entraîne l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et de la protéine APP et augmente le clivage de l'APP et la production d'A β . L'augmentation de l'expression de CIP2A serait également responsable de la localisation aberrante de Tau vers les dendrites et de la dégénérescence synaptique associée, ce qui confirme l'importance de PP2A dans la MA (Shentu et al., 2018).

4.2.4 Implication des médiateurs de l'inflammation

Il est possible que les interactions entre Tau et APP ne soit pas entièrement médiées par les neurones, et que la microglie ou les astrocytes puissent également être impliqués. La microglie en particulier semble lier Tau et A β : la microglie devient réactive au contact d'A β et est capable de phagocyter les peptides A β grâce au récepteur TLR2 ; par ailleurs il a été montré que la microglie réactive est capable d'entraîner une pathologie Tau et est en corrélation avec la propagation d'espèces de Tau pathologiques dans le cerveau (Maphis et al., 2015). L'inflammasome NLRP3 s'assemble à l'intérieur de la microglie lors de son activation, entraînant une augmentation du clivage et de l'activité de la caspase-1 ainsi que la libération d'IL-1 β . L'injection intracérébrale d'A β chez la souris induit une pathologie Tau d'une manière dépendante de NLRP3, et la perte de la fonction de l'inflammasome NLRP3 réduit l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau en régulant ses kinases et phosphatases. NLRP3 semble ainsi médier la pathologie Tau induite par A β dans les cellules microgliales (Ising et al., 2019).

De nombreuses preuves expérimentales et cliniques indiquent à présent que A β et Tau potentialisent leurs effets néfastes et agissent en synergie pour aggraver la pathologie Alzheimer. La compréhension limitée du lien entre l'accumulation d'A β et le dépôt de protéine Tau dans la MA est un élément clé qui manque à notre connaissance du mécanisme de la maladie et peut être un facteur d'échec des thérapies A β existantes dans les essais cliniques. De plus, ce modèle synergique semble indiquer une meilleure efficacité d'une approche thérapeutique combinée ciblant à la fois les voies pathologiques A β et Tau (Pascoal et al., 2017).

Chapitre 5 : La thérapeutique anti-Alzheimer

I. Stratégies thérapeutiques existantes

Il y a actuellement 121 agents en essais cliniques déclarés pour le traitement de la MA : 29 sont en essais cliniques de phase 3, 65 sont en essais de phase 2 et 27 en essais de phase 1 (Cummings et al., 2020) (Figure 21). Depuis le début des années 2000, la plupart des thérapies développées se sont basées sur l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy and Selkoe, 2002), qui prédit qu'en agissant sur la pathologie amyloïde, un traitement devrait ralentir ou bloquer la MA. Mais toutes les thérapies ayant ciblé uniquement la pathologie amyloïde demeurent sans efficacité avérée encore aujourd'hui, une seule thérapie ayant obtenu une mise sur le marché très récente et conditionnelle. La suppression des plaques uniquement (objectivée par l'imagerie) ne montre pas d'effet sur la cognition.

Très récemment, en juin 2021, la Food and Drug Administration (FDA) américaine a annoncé l'approbation historique de l'aducanumab (commercialisé sous le nom AduhelmTM) développé par Biogen pour le traitement de la MA (10 mg/kg), suite aux essais cliniques ENGAGE et EMERGE (Sevigny et al., 2016). Il s'agit du tout premier traitement approuvé pour traiter la pathologie sous-jacente et agir peut-être sur une cause possible de la MA, pas seulement sur les symptômes. Cette autorisation de mise sur le marché est conditionnelle et plusieurs effets secondaires indésirables sont à surveiller (céphalées).

apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament : la mémantine (EbixaTM). Il est indiqué chez les patients plus avancés, des stades modérément sévères à sévères, mais peut présenter toutefois des effets secondaires indésirables au niveau digestif (nausées, perte d'appétit ou troubles gastro-intestinaux) (dos Santos Pisoni et al., 2010; Gholivand et al., 2010). Ces molécules sont des traitements symptomatiques, qui à présent ne sont plus remboursés en France.

Parallèlement aux thérapies ciblant les symptômes de la maladie, il existe plusieurs méthodes afin de développer des thérapies agissant à la source de la pathologie Alzheimer, sur les lésions Tau ou A β , directement ou indirectement.

5.1.1 Les thérapies ciblant le peptide A β

Immunothérapies

En 2000, il a été montré par Janus et collaborateurs que l'immunisation par l'A β pouvait réduire à la fois le dépôt d'A β fibrillaire cérébral et le dysfonctionnement cognitif dans le modèle murin TgCRND8 de la maladie d'Alzheimer, sans toutefois altérer les niveaux totaux d'A β dans le cerveau. Cela impliquait selon cette équipe qu'une réduction de 50 % des plaques A β serait suffisante pour affecter la cognition, ou que la vaccination pouvait moduler l'activité particulièrement toxique d'une petite sous-population d'espèces d'A β (Janus et al., 2000). Depuis, différentes approches pharmacologiques, génétiques et immunologiques visant à réduire la charge cérébrale en A β chez les souris modèles de la MA, ont permis de diminuer la perte synaptique et de remédier aux déficits mnésiques (Li et al., 2013). Ces résultats ont convaincu la communauté scientifique de la validité de l'hypothèse amyloïde, donnant le feu vert à une série d'essais cliniques (Ricciarelli and Fedele, 2017). Les essais cliniques se concentrent généralement sur un ou deux paramètres objectivables pour mesurer les résultats de l'étude, qui seront en général une augmentation des fonctions cognitives évaluées sur la base d'un test mnésique, et/ou un ralentissement de la progression des lésions en imagerie.

Depuis, les tentatives pour diminuer la neurodégénérescence causée par les espèces A β tentent de programmer le système immunitaire du patient pour se débarrasser des peptides A β en empêchant la formation de plaques amyloïdes. C'est ce qu'on appelle l'immunothérapie active, pour cela est utilisé un peptide A β synthétique, ou un fragment de la protéine, pour stimuler la production d'anticorps par les cellules du système immunitaire. En théorie les anticorps

neutralisent les peptides A β et le complexe est éliminé du cerveau (Barrera Ocampo and Lopera, 2016). En 2000, AN-1792, le premier vaccin contre l'A β 1-42 a été testé en phase 2 sur des patients atteints de MA et, bien que l'essai ait dû être arrêté en raison d'effets secondaires graves, les résultats chez les répondeurs aux anticorps n'étaient pas différents de ceux des témoins traités par placebo (Gilman et al., 2005). Plus récemment, ABvac 40, développé par Araclon Biotech est actuellement en phase 2 des essais cliniques pour la MA. ABvac40 est un vaccin expérimental ciblant l'extrémité C-terminale du peptide A β 1-40. 135 participants randomisés ont été enrôlés dans cette étude pour recevoir un traitement ou un placebo, étude qui devrait se terminer en février 2022 (Lacosta et al., 2018). L'immunisation active a l'avantage d'être de longue durée car elle induit une mémoire immunologique. Les vaccins actifs sont faciles à administrer et la production est rentable. Cependant, la réponse immunitaire dépend du système immunitaire de l'hôte et il existe une variabilité dans la réponse anticorps selon les patients (Winblad et al., 2014).

L'immunothérapie passive utilise des anticorps monoclonaux (mAb), qui agissent à travers trois mécanismes qui ont lieu une fois que l'anticorps a franchi la barrière hémato-encéphalique (Lichtlen and Mohajeri, 2008; Morrone et al., 2015). Le premier est médié par l'interaction A β -mAb, qui diminue la formation d'agrégats toxiques. Le deuxième implique l'activation de l'effet de cytotoxicité dépendant du complément par le complexe A β -mAb produisant la lyse de la cellule cible. Le troisième mécanisme nécessite la liaison entre le domaine Fc du mAb et les récepteurs Fc- γ présents sur la microglie, conduisant à la phagocytose du complexe A β -mAb. Il existe un quatrième mécanisme d'action dans lequel le mAb interagissait avec A β et créerait un gradient de concentration qui provoquerait l'efflux d'A β du cerveau (Barrera Ocampo and Lopera, 2016). L'immunothérapie passive ne nécessite pas que le système immunitaire génère une réponse immunitaire mais la production est coûteuse et la courte demi-vie des anticorps oblige une administration systémique chronique (i.v.)(Jadhav et al., 2019).

Le bapineuzumab a été le premier anticorps anti-A β dirigé contre la partie N-terminale de l'A β (A β 1-5, capable de se lier aux formes fibrillaires, oligomères et monomères) à être testé chez l'Homme. Dans un premier essai de phase 2, les résultats d'efficacité avec cet anticorps monoclonal humanisé ont montré qu'il n'y avait pas d'amélioration cognitive chez les patients atteints de MA traités (Salloway et al., 2009, 2014). Malgré cet échec, un autre anticorps monoclonal humanisé nommé solanezumab a été développé qui, contrairement au bapineuzumab, reconnaît le monomère A β soluble et non fibrillaire. Dans un premier essai de

phase 2, le solanezumab s'est avéré augmenter les taux plasmatiques d'A β dans le LCR de manière dose-dépendante, un résultat compatible avec l'augmentation de la clairance des plaques dans le cerveau ; mais il n'a eu aucun effet significatif sur la cognition tel qu'évalué par ADAS-Cog (Farlow et al., 2012). Néanmoins, le solanezumab est entré dans deux essais de phase 3 en double aveugle, randomisés et contrôlés avec placebo. Cet anticorps n'a pas atteint le critère d'évaluation principal, les patients ne présentant pas de ralentissement significatif du déclin cognitif. Il est actuellement toujours en phase 3. Sur la base de la connaissance du rôle neuromodulateur de l'A β , un anticorps se liant et éliminant sélectivement les oligomères et les fibrilles A β pourrait être plus bénéfique qu'un autre dirigé également contre les monomères A β (Fagiani et al., 2021).

Le gantenerumab est un anticorps humain dirigé contre les formes agrégées d'A β , qui reconnaît à la fois l'extrémité N-terminale et le domaine médian d'A β (Bohrmann et al., 2012; Novakovic et al., 2013). Dans un premier essai en double aveugle, randomisé et contrôlé par placebo, il a été démontré que le gantenerumab réduisait les taux d'amyloïde cérébral de manière dose-dépendante chez les patients atteints de MA légère à modérée (différence de 36 % par rapport au placebo à la dose testée la plus élevée) (Ostrowitzki, 2012). Il est actuellement toujours en phase 3 pour la MA.

Petites molécules thérapeutiques

Parallèlement aux anticorps, plusieurs petites molécules inhibitrices/modulatrices de sécrétases ont été développées :

La sélégiline, un inhibiteur sélectif de la monoamine oxydase utilisé pour ralentir la progression de la MA, s'est avérée augmenter l'activité de l' α -sécrétase via un mécanisme lié au trafic de protéines. L'atorvastatine, utilisée pour traiter la MA après qu'il a été démontré que l'utilisation chronique de statines peut être protectrice, semble également induire l'activation de l' α -sécrétase. Le composé Etazolate (EHT 0202), un modulateur du récepteur GABA, a atteint les essais cliniques de phase 2 chez l'Homme après avoir démontré qu'il pouvait stimuler la production des fragments sAPP α et protéger contre la toxicité induite par l'A β dans les neurones corticaux du rat (MacLeod et al., 2015).

De grands efforts de recherche ont également été fait vers l'inhibition de BACE1. Le développement d'inhibiteurs avec des poids moléculaires suffisamment bas pour permettre le passage de la BHE, avec une affinité élevée pour le site actif de BACE1 et une sélectivité

suffisante pour épargner son homologue BACE2 s'est avéré être un vrai défi. Peu d'études ont montré que les inhibiteurs de BACE1 inversent ou atténuent les déficits de la mémoire et du comportement dans les modèles murins transgéniques de la MA, et malgré 80 à 90 % de réduction de l'A β dans le LCR chez l'Homme, les inhibiteurs de BACE1 testés chez des patients atteints de MA légère à modérée ou prodromique n'ont pas démontré de ralentissement du déclin cognitif. Parmi les inhibiteurs de la β -secrétase qui sont passés aux essais de phase 2 ou 3 sur des patients atteints de MA modérée les composés LY2886721 et RG7129 ont été arrêtés en raison d'une toxicité hépatique qui semblait être due à des effets hors cible (Barão et al., 2016). Se sont également terminés sans résultats concluants les essais cliniques de l'elenbecestat (E2609), du lanabecestat (LY331481) et du verubecestat (MK-8931) de Merck. Les raisons de ces résultats décevants incluent probablement l'inhibition des autres substrats physiologiques importants de BACE1, ce qui rend son inhibition à long-terme problématique (Imbimbo and Watling, 2019). Une inhibition limitée de BACE1 semble représenter une approche plus viable (McLeod et al, 2015).

Les inhibiteurs de la γ -secrétase sont devenus l'objet d'une attention intense dans la recherche pharmaceutique il y a de nombreuses années, car ils ont été facilement identifiés dans le criblage de composés qui diminuait le clivage A β (Haass et al., 1992). Le tarenflurbil a été le premier modulateur de la γ -secrétase testé chez les patients atteints de MA, mais dans une étude de phase 3 il n'a montré aucun effet bénéfique (Wilcock et al., 2008; Green, 2009). Le sémagacestat (LY-450139) est un inhibiteur de la γ -secrétase qui a été testé dans deux grands essais de phase 3 randomisés, en double aveugle, contrôlés par placebo sur des patients atteints de MA légère à modérée. Les deux études ont été interrompues avant leur achèvement, car le traitement par sémagacestat était inefficace ou a même aggravé le déclin cognitif, avec des effets indésirables significatifs par rapport au placebo (Doody et al., 2013, 2015). Ces effets indésirables sont notamment liés à l'inhibition du clivage médié par la γ -secrétase de Notch, une protéine qui joue un rôle fondamental dans le développement et la différenciation cellulaire (Zhang et al., 2014). Le begacestat (GSI-953) et l'avagacestat (BMS-708163) sont deux autres inhibiteurs de la γ -secrétase qui ont été revendiqués pour épargner Notch (Mayer et al., 2008; Gillman et al., 2010), bien qu'il se soit avéré que ce n'était pas le cas (Crump et al., 2012). Aucun des deux inhibiteurs n'a démontré d'effet modulateur de la maladie (Martone et al., 2009; Coric et al., 2015).

Que ce soit pour la β -secrétase ou la γ -secrétase, des problèmes de toxicité avaient été prédits et jusqu'à présent, les essais cliniques ont montré un cruel manque d'effets positifs sur la

cognition (MacLeod et al., 2015; Ricciarelli and Fedele, 2017). Le manque de connaissances sur la maladie, le manque d'outils précis pour le diagnostic précoce, l'incertitude pour évaluer les stades de la maladie et la rigidité du processus classique de découverte de médicaments peuvent avoir contribué à l'échec des stratégies thérapeutiques essayées au cours des deux dernières décennies.

5.1.2 Les thérapies ciblant la protéine Tau

Les approches expérimentales pour réduire les niveaux globaux de Tau comprennent le développement d'anticorps anti-Tau, des oligonucléotides antisens ciblant la protéine Tau et le développement de petites molécules qui peuvent moduler la production ou la dégradation de Tau.

Immunothérapies

Parmi ces approches, plusieurs immunothérapies passives ont montré des effets prometteurs sur la prévention de l'accumulation pathologique de Tau dans les essais précliniques dans les modèles murins. Les anticorps thérapeutiques anti-Tau neutralisent les formes monomériques (Boutajangout et al., 2011; Yanamandra et al., 2013, 2015), agrégées (Castillo-Carranza et al., 2014), ou avec une phosphorylation ou une conformation anormale de la protéine Tau (Chai et al., 2011; Gu et al., 2013; Kontseкова et al., 2014; Walls et al., 2014), empêchant ainsi la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires. Les anticorps anti-Tau peuvent avoir différents sites de liaison sur Tau : ils reconnaissent soit l'extrémité N-terminale (Dai et al., 2015; Agadjanyan et al., 2017), la région riche en proline, la région de liaison aux microtubules (Yanamandra et al., 2013) ou l'extrémité C-terminale (Ittner et al., 2015). Actuellement, seule une poignée d'anticorps Tau humanisés sont à l'étude à divers stades de développement clinique. L'anticorps UCB0107 (bepranemab) qui cible la région médiane de Tau est actuellement en phase 1 (volontaires sains) (Albert et al., 2019). Janssen a également démarré un essai clinique de phase 2 dans la MA légère avec l'anticorps JNJ-63733657. L'anticorps LY3303560 (zagotenemab, anticorps MC1 modifié) reconnaissant à la fois l'extrémité N-terminale et le domaine de liaison aux microtubules est en essai de phase 2. Enfin, l'anticorps BIIB076 qui a la capacité de se lier aux formes monomériques et fibrillaires de Tau est testé dans un essai clinique de phase 1 pour la MA (Congdon and Sigurdsson, 2018).

Comme leurs homologues d'immunothérapie passive, les vaccins actifs ciblant la région médiane, le domaine de liaison aux microtubules et l'extrémité C-terminale ont été largement caractérisés dans des études précliniques. La plupart de ces études ont démontré une réduction de la pathologie Tau ainsi qu'une amélioration des capacités cognitives chez les animaux (Asuni et al., 2007; Theunis et al., 2013; Rajamohamedsait et al., 2017). En comparaison avec l'immunothérapie Tau passive, il n'y a que deux vaccins Tau actifs qui ont été testés chez l'Homme, tout deux en phase 2 d'essai clinique actuellement : l'AADvac1 de Axon Neuroscience SE et le vaccin ACI-35 de Janssen (Theunis et al., 2013, 201; Kontsekova et al., 2014; Novak et al., 2018).

En plus des immunothérapies classiques, une immunothérapie d'un nouveau genre a vu le jour il y a quelques années : des anticorps à domaine variable unique sur une chaîne lourde (VHH), ou 'nanobodies', issus des camélidés. Les 'nanobodies' sont intéressants car ils sont plus petits que les IgG basiques et morphologiquement flexibles (Bannas et al., 2017). Ces deux propriétés leur permettent de pénétrer dans la cellule où ils peuvent cibler spécifiquement Tau même s'il se trouve dans des structures cellulaires complexes. Récemment, un VHH dirigé contre un épitope dans le domaine C-terminal de la protéine Tau et appelé F8-2 a montré une forte capacité d'élimination de Tau (Dupré et al., 2019).

Autres stratégies thérapeutiques novatrices

Une approche pour réduire les niveaux de protéine Tau implique la génération de chimères ciblant la protéolyse (PROTAC). Ce sont des molécules accélératrices de dégradation qui relient un domaine de reconnaissance cible à une ubiquitine ligase qui va aider à transporter la molécule cible vers les voies de dégradation protéique, en particulier le protéasome. De tels composés sont prometteurs pour la dégradation ciblée de Tau et sont en cours d'évaluation préclinique (Silva et al., 2019; Burslem and Crews, 2020).

Une autre stratégie pour réduire les niveaux globaux de Tau chez l'Homme est l'injection par ponction lombaire d'oligonucléotides antisens (ASO) capables de se lier spécifiquement à l'ARNm de *MAPT*, de favoriser sa dégradation et ainsi atténuer la production de protéine Tau. Cette approche diminue efficacement les niveaux globaux de Tau et la neurodégénérescence dans le cerveau des rongeurs (DeVos et al., 2013, 2017). Une approche basée sur l'ASO est déjà entrée dans la phase 1 des essais cliniques (Mignon et al., 2018). Cependant, étant donné que les ASO sont de grosses molécules chargées négativement qui sont sujettes à la dégradation, les ASO traversant la BHE et le maintien de niveaux efficaces dans les tissus cérébraux

nécessitent des ponctions lombaires répétées, qui ne sont pas optimales pour le traitement prolongé des maladies chroniques du cerveau chez les personnes âgées. Ainsi, le développement de petites molécules médicaments efficaces pour réduire la pathologie Tau et pouvant être administrés par voie orale est un objectif important (Jadhav et al., 2019).

La protéine Tau hyperphosphorylée est sensible à l'agrégation et perd ses propriétés de stabilisation des microtubules du cytosquelette, entraînant des dommages neuronaux et la mort cellulaire. Les petites molécules capables de prévenir l'agrégation peuvent représenter une stratégie prometteuse pour un traitement efficace de la MA (Wischik et al., 2014; Jouanne et al., 2017). Les deux approches principales se concentrent sur la phosphorylation de Tau et la prévention de son oligomérisation (Figure 22). La première implique des inhibiteurs des kinases qui phosphorylent Tau ou des activateurs de phosphatase qui déphosphorylent la protéine et la deuxième recherche des inhibiteurs directs du processus d'agrégation de Tau (Ahmed et al., 2015; Li and Götz, 2017). Dans les inhibiteurs de phosphorylation, les inhibiteurs de la kinase GSK-3 sont les plus étudiés. Ils agissent principalement en entrant en compétition avec le site de liaison ATP de la kinase. Le tidéglusib est une petite molécule de la classe des thiadiazolidinones possédant une action inhibitrice de GSK-3, mais elle fut arrêtée en phase 2 (Lovestone et al., 2015). Le sel de lithium est également un inhibiteur sélectif connu de la GSK-3, et son mécanisme d'action biologique n'est toujours pas entièrement connu (Macdonald et al., 2008). La première molécule visant à inhiber l'agrégation de Tau est une forme purifiée du bleu de méthylène nommée Rember, qui a échoué en essai clinique en raison d'effets secondaires (O'Leary et al., 2010). Une seconde formulation du bleu de méthylène, TRx0237 (LMTX™), est actuellement en phase 3 pour la MA et la démence frontotemporale. Une autre source potentielle d'agents anti-agrégation est fournie par l'approche du ligand multi-cibles, un exemple étant l'AZP2006 (ezeprogind), dont nous reparlerons plus en détails dans le chapitre suivant.

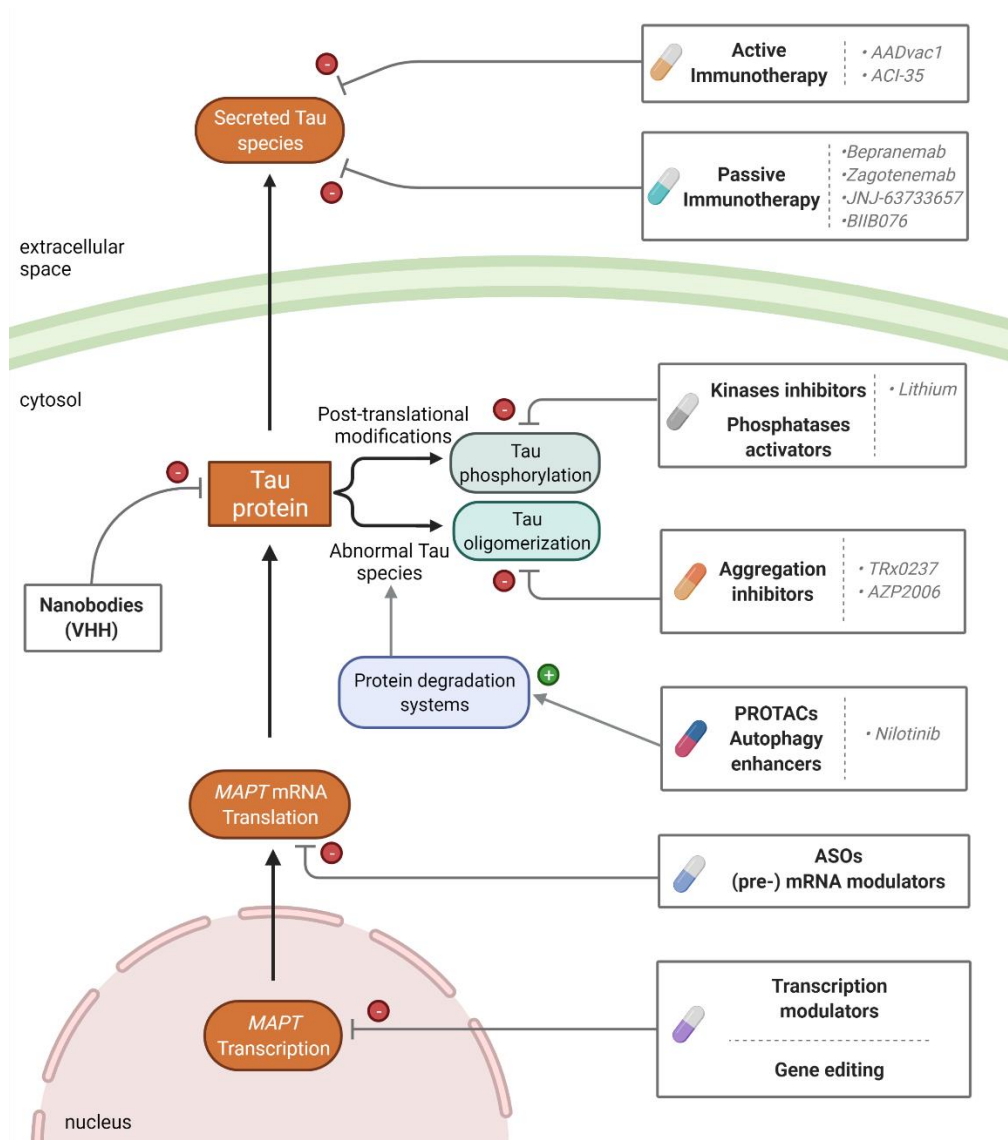


Figure 22 : **Les différentes approches thérapeutiques ciblant la protéine Tau.** Les approches futures ciblant la protéine Tau de sa transcription à sa libération dans l'espace extracellulaire devront prendre en considération les éventuels effets secondaires et hors-cible sur la physiologie de la cellule. Adapté d'après Chang et al., 2021.

Une hypothèse très exploitée depuis quelques années est l'idée de développer ou de repositionner des molécules duales ou multi-action du fait de la nature multi-lésionnelle de la MA. Parmi celles-ci, l'azeliragon de Pfizer, un antagoniste du récepteur RAGE agissant sur la pathologie amyloïde ainsi que sur l'inflammation, a atteint les essais cliniques de phase 3 avant d'être arrêté faute d'efficacité (NCT03980730). De même, une petite molécule inhibitrice de tyrosine kinase Abl, le nilotinib, a été repositionnée de la leucémie sur la MA pour son activité d'activation de l'autophagie. Dans des modèles pré-cliniques, il a été rapporté que le nilotinib améliore la clairance de Tau et la fonction astrocytaire chez les souris Tau P301L et favorise la

clairance amyloïde chez les souris TgAPP (Lonskaya et al., 2013; Hebron et al., 2018) : il s'agirait donc une molécule agissant indirectement sur les deux lésions. Récemment, le nilotinib a terminé son essai clinique de phase 2, avec des résultats encourageants montrant une molécule bien tolérée qui a permis de réduire la charge amyloïde dans le lobe frontal par rapport au groupe placebo. Les taux d'Aβ1-40 dans le LCR ont été réduits à 6 mois et les taux d'Aβ1-42 ont été réduits à 12 mois. La perte de volume hippocampique a été atténuée (-27 %) à 12 mois et le phospho-Tau 181 a été réduit à 6 mois et 12 mois dans le groupe traité au nilotinib (Turner et al., 2020).

Il est maintenant généralement admis qu'un grand nombre d'essais cliniques de traitement de la MA pourraient avoir échoué car ces essais auraient commencé trop tard, les patients étaient trop avancés dans le processus de la maladie pour voir les effets d'une potentielle thérapie (Sperling et al., 2011; Drachman, 2014). Au vu de l'absence d'effets positifs, la fenêtre thérapeutique est maintenant ciblée sur des patients à un stade moins avancé. Une autre explication de l'échec de nombre de ces thérapies est qu'elles aient ciblé en grande majorité soit la protéine Tau soit le peptide Aβ. Agir plutôt sur ces deux lésions à la fois ou à l'intersection de ces mécanismes physiopathologiques permettrait un traitement curatif ou, tout au moins, un ralentissement de la progression de la maladie (Karran et al., 2011; Reitz, 2012). De nombreux groupes de recherches se sont maintenant lancés sur cette voie.

II. Preuve de concept : les molécules MSBD (1^{ère} génération)

En 2002, l'équipe du Dr. Delacourte met en évidence que les deux lésions qui sous-tendent la pathologie dans la MA, la protéine Tau et le peptide Aβ, pourraient agir en synergie (Delacourte et al., 2002). L'équipe avait observé une diminution des APP-CTF en lien avec la progression de la pathologie Tau (Sergeant et al., 2002). L'hypothèse de départ était donc qu'il faudrait augmenter les CTFs et diminuer les fragments Aβ pour agir sur la pathologie Tau puisque qu'une synergie existerait entre les deux lésions. Les travaux de l'équipe du Dr. Greengard du début des années 90 suggèrent à l'époque que la chloroquine (CQ) aurait la propriété recherchée (Caporaso et al., 1992). A partir de ce constat, la collaboration avec l'équipe de chimie thérapeutique du Pr. Patricia Melnyk a permis de passer au crible une chimiothèque (développée pour pallier à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine) composée de plus de 200 dérivés de la CQ, afin d'identifier des composés montrant un effet intéressant sur le

métabolisme de l'APP et une toxicité limitée (Bonnet et al., 2000; Ryckebusch et al., 2003b, 2003a). La chloroquine est une dibase faible qui peut exister sous forme libre ou protonée. La CQ libre peut diffuser librement à travers les membranes des organites intracellulaires jusqu'aux lysosomes et autres compartiments acides. Une fois protonée, la CQ se retrouve piégée dans ces compartiments où elle s'accumule, ne pouvant en sortir. Ainsi, la CQ et ses dérivés sont considérés comme des agents lysosomotropiques ou alcalinisants. En s'accumulant de façon irréversible dans ces organelles acides, ils induisent une augmentation du pH due à la capture des ions H^+ (Al-Bari, 2015). Cette interférence avec l'activité lysosomale conduit à son tour une altération de la protéolyse, notamment celle de l'APP (Caporaso et al., 1992; Wolozin et al., 1992; Schrader-Fischer and Paganetti, 1996; Tam et al., 2014). La CQ a été développée au cours de la seconde guerre mondiale pour traiter le paludisme, également appelé malaria, une maladie infectieuse due à un parasite du genre *Plasmodium*, propagée par la piqûre de certaines espèces de moustiques anophèles. La CQ inhibe la polymérisation de l'hème, présent dans la vacuole digestive du parasite au sein des érythrocytes, induisant une toxicité mortelle pour celui-ci (Slater, 1993). Suite à une série de stratégies de repositionnement, la CQ et ses composés dérivés ont déjà été évalués pour différentes applications thérapeutiques telles que la maladie à prions (Korth et al., 2001; Klingenstein et al., 2006), le virus de l'hépatite C (Blanchard et al., 2006; Ashfaq et al., 2011) et même le cancer (Vazquez-Martin et al., 2011; Mahoney et al., 2013; Hounjet et al., 2019). Cependant la CQ possède trop d'effets secondaires indésirables à long terme et n'est donc pas utilisable telle quelle pour le traitement de maladies chroniques ou dégénératives : la CQ entraîne une accumulation des formes pathologiques de Tau dans le cerveau ou le muscle (Murakami et al., 1998; Takeuchi and Takeuchi, 2001).

L'objectif était d'identifier un composé non toxique capable de rediriger le métabolisme de l'APP vers la voie non amyloïdogénique, pouvant ainsi diminuer le niveau des peptides A β longs toxiques et augmenter le niveau d'AICD et de sAPP α avec une plus grande efficacité que la CQ ou d'autres composés lysosomotropiques. La protéolyse de l'APP ayant lieu majoritairement dans les lysosomes, la capacité des composés à s'accumuler dans les vésicules acides telles que les lysosomes a été augmentée en ajoutant une chaîne latérale bis(aminoalkyl)pipérazine. Ensuite, des composés dans lesquels la sous-structure quinoléine a été remplacée par divers hétérocycles ou aromatiques ont été étudiés, avec une chaîne amino aliphatique offrant une meilleure efficacité. Enfin, l'importance de la symétrie des composés a été évaluée. Tous les composés, regroupés dans une famille nommée MSBD, ont été testés pour leur interférence potentielle avec le traitement de l'APP dans une lignée cellulaire de

neuroblastomes humains SY5Y exprimant de manière stable l'isoforme neuronale de l'APP695 de type sauvage humain (SY5Y-APPwt). Parmi ces molécules, une possédait une faible toxicité et a fourni des résultats intéressants *in vitro* : l'AZP2006 (composé 29) (Melnik et al., 2006, 2015). La pharmacomodulation de la structure chimique des MSBD a permis la redirection du métabolisme de l'APP vers une augmentation des fragments APP-CTF α , sAPP α et AICD et la diminution des fragments A β et APP-CTF β , tout en gardant l'activité lysosomotropique caractéristique de la CQ. L'AZP2006 a montré des résultats *in vivo* prometteurs chez la souris à une dose unique de 25 mg/kg, avec une augmentation des APP-CTF α de 29 % dans le cortex frontal et de 20 % dans l'hippocampe (Melnik et al., 2015). Cette molécule possède également une activité anti-inflammatoire et anti-oxydante ; elle est actuellement en phase 1 pour la MA et en phase 2 pour la paralysie supranucléaire progressive (PSP) avec la société AlzProtect (NCT04008355).

Une seconde famille de molécules a également été synthétisée, les PMAD. Les molécules de cette famille sont des dérivés d'une autre molécule anti-paludisme, l'amodiaquine, obtenus en remplaçant le fragment aminophénol de l'amodiaquine par des fragments 2-aminométhylaniline et 2-aminométhylphényle (Gay et al., 2018, Delacourte et al, US/2012/0283256). Ces molécules possèdent une capacité similaire de modulation du métabolisme de l'APP pour le rediriger vers une diminution de la libération du peptide A β et une stabilisation des CTF α et AICD également (Figure 23).

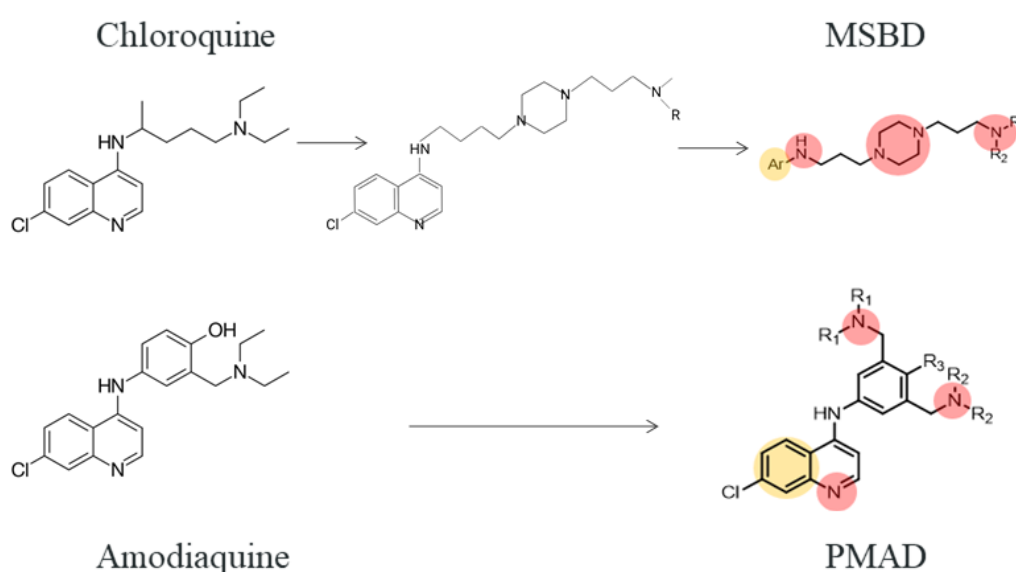


Figure 23: **Les structures chimiques de la chloroquine et de l'amodiaquine, ainsi que les squelettes respectifs des MSBD et des PMAD.** En rouge, les groupements azotés responsables des propriétés basiques des molécules ; en jaune, les cycles aromatiques.

III. Les nouveaux composés PEL et MAGS (2^{ème} génération)

Malgré les similitudes d'activités entre les MSBD, les PMAD et la CQ, ces composés ont une structure chimique complètement différente et leur mécanisme d'action regroupe une activité lysomotropique qui, par hypothèse, inhibe indirectement la β -secrétase en alcalinisant le pH (non formellement démontré pour ces molécules *in vitro*) et bloque également la production des peptides A β . Cependant, l'analyse des relations structure-activité entreprises (c'est-à-dire des modifications structurales sur les molécules pour en étudier l'effet sur le métabolisme de l'APP) a montré que ces deux activités n'étaient pas forcément liées. Une stratégie 'Ligand-based drug design' a ensuite été menée sur la seule base des informations structurales des molécules MSBD et PMAD : la conception de nouvelles molécules basée sur un ligand est une approche utilisée en l'absence d'information sur le récepteur et repose sur la connaissance des molécules qui se lient à la cible biologique d'intérêt. Les relations d'activité de structure quantitative 3D (QSAR 3D) et la création d'un modèle pharmacophorique sont les outils les plus largement utilisés dans les approches « Ligand-based ». Ici, le choix a été fait de l'identification d'un pharmacophore commun à partir des structures des molécules les plus efficaces de chaque série : l'AZP2006 pour les MSBD et l'AZP7015 pour les PMAD, afin de comprendre comment des molécules différentes pouvait avoir le même mode d'action. Il est composé de 3 centres basiques protonables et un cycle aromatique. Un pharmacophore est une structure modèle rassemblant l'ensemble des groupements fonctionnels disposés selon un arrangement spatial adéquat, assurant la fixation du médicament sur le récepteur et donc capable d'induire la réponse physiologique.

Cette approche pharmacophorique a donc conduit à la conception et la synthèse de plusieurs familles de molécules (Gay et al., 2018a, 2018b)(Figure 24). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux composés de l'une de ces familles contenant plusieurs molécules lysomotropiques et modulatrices de la β -secrétase (dont la molécule **MAGS02-14**) d'un côté et des molécules ayant uniquement l'activité indirecte d'inhibition de la β -secrétase (dont la molécule **PEL24-199**) de l'autre (ces molécules possèdent un pKa autour de 8-9) (Gay et al., 2018b, patent WO2020011848A1). Il s'agit en effet d'une modulation indirecte puisque

l'activité aspartyle protéase de la β -secrétase n'est pas inhibée *in vitro*. Ce test enzymatique repose sur le suivi du clivage d'un substrat peptidique fluorogénique par la β -secrétase. Le substrat est composé d'un groupement donneur de fluorescence et d'un groupement accepteur neutralisateur de fluorescence. Lors du clivage du substrat par l'enzyme, le fluorophore donneur est séparé du fluorophore accepteur rétablissant une fluorescence optimale du donneur et permettant de mesurer si le clivage est inhibé. Aucune inhibition du clivage du substrat peptidique fluorogénique par la β -secrétase n'a été obtenue à 10 μ M pour MAGS et PEL, contrairement à l'OM99-2 qui est l'inhibiteur peptidique pris pour référence. Par conséquent, ces deux composés n'agissent pas directement sur la sous-unité catalytique mais par un mécanisme indirect pour inhiber l'activité de la β -secrétase.

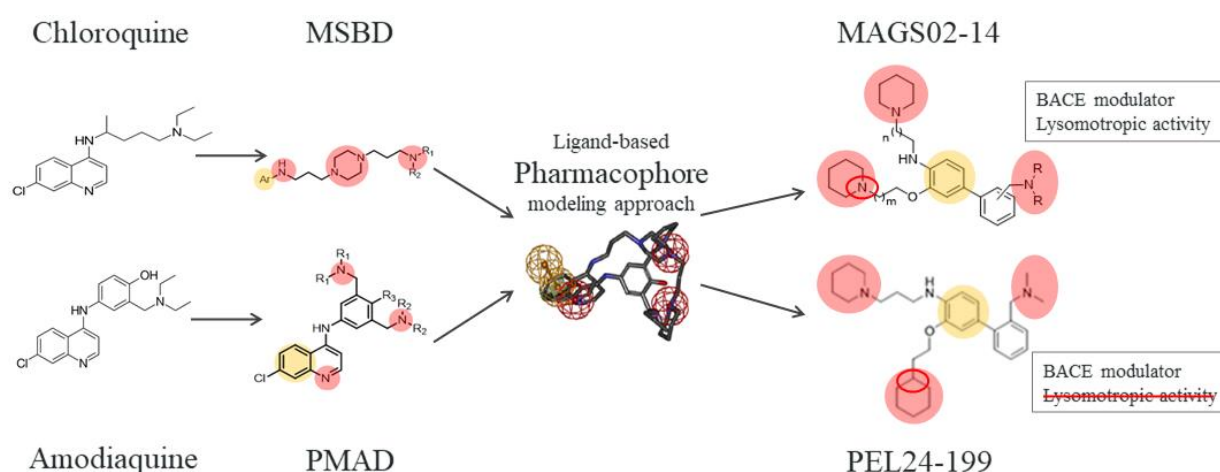


Figure 24 : **Schéma synthétique de l'approche de synthèse des molécules MAGS02-14 (MAGS) et PEL24-199 (PEL).** Un pharmacophore a été modélisé à partir des molécules les plus efficaces de chaque famille, MSBD et PMAD, pour aboutir à PEL et MAGS, qui diffèrent par un unique atome d'azote (en rouge). MAGS possède une activité modulatrice d'inhibition de BACE1 et l'activité lysosomotropique caractéristique de la chloroquine, tandis que PEL ne possède que l'activité d'inhibition de BACE1.

Les deux composés MAGS02-14 et PEL24-199 (appelés après dans ce manuscrit MAGS et PEL) diffèrent par un unique atome, d'azote pour MAGS et un carbone pour PEL. Si la dégradation des A β 1-X a bien été favorisée, il a été observé une diminution des espèces A β 1-X sans pour autant de changement des espèces A β X-40/42. Ces molécules se sont avérées réduire significativement les sAPP β . A l'opposé, la concentration de sAPP α a été significativement augmentée par MAGS et dans une moindre mesure par PEL (Gay et al 2018)(Figure 25).

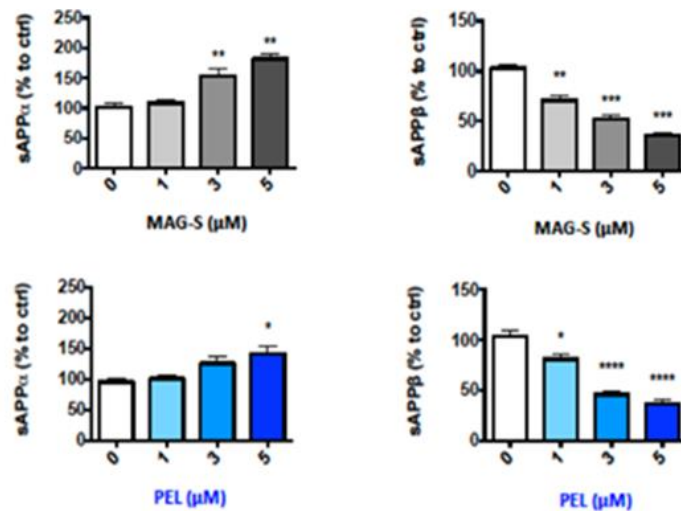


Figure 25 : **MAGS et PEL augmentent les sAPPα et diminuent les sAPPβ.** Des doses croissantes (0, 1, 3 et 5 μM) de MAGS pendant 24h augmentent significativement les sAPPα *in vitro* dans un modèle de SY5Y-APPwt et diminuent très significativement les sAPPβ. PEL diminue également significativement les sAPPβ à 1, 3 et 5 μM. Une dose de 5 μM de PEL permet d'augmenter les sAPPα mais dans une moindre mesure que MAGS (Gay et al., 2018b).

MAGS a également démontré sa capacité d'inhibition du flux autophagique *in vitro* en augmentant l'accumulation des marqueurs d'autophagie p62 et LC3, contrairement à PEL qui ne possède pas cet effet d'inhibition de l'autophagie (Figure 26).

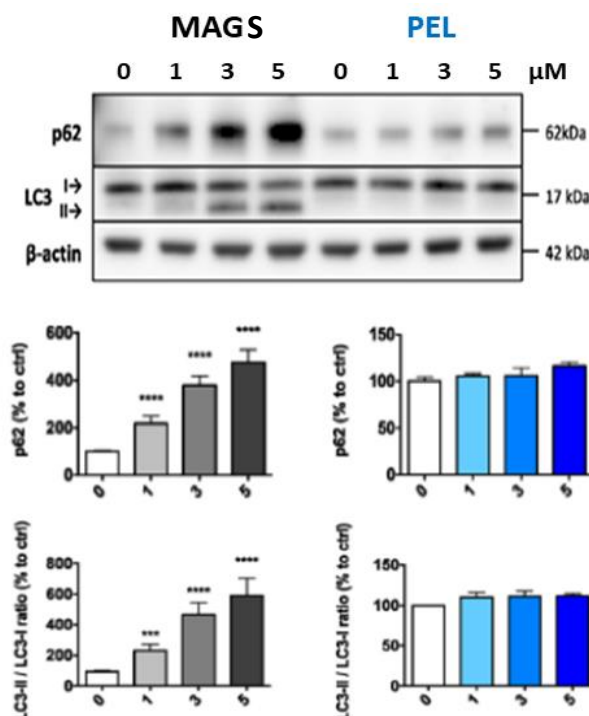


Figure 26 : **MAGS, mais pas PEL, mène à l'accumulation des vésicules autophagiques.** Les marqueurs du flux autophagiques p62 et LC3 sont significativement augmentés à la suite d'un traitement

de 24h avec MAGS dans un modèle de SY5Y-APPwt, indiquant que MAGS bloque le flux autophagique, contrairement à PEL qui n'a aucun effet sur ces deux marqueurs et ne bloque pas le flux autophagique (Gay et al., 2018b).

La cible exacte de l'ensemble des composés, et notamment MAGS et PEL, n'a pas encore été identifiée, et les mécanismes d'inhibition ne sont pas encore connus.

Comme vu précédemment dans cette introduction, de plus en plus de preuves suggèrent que le métabolisme de l'APP est lié à celui de la protéine Tau et régulerait son expression. Les systèmes d'homéostasie cellulaire des protéines qui sont régulés par l'autophagie et les voies endosome/lysosome se situent au carrefour du métabolisme APP et Tau, et leur dérégulation pourraient également influencer sur les deux voies pathologiques. Ces molécules pourraient ainsi potentiellement influencer à la fois sur les plaques amyloïdes et sur la protéine Tau, faisant de cette approche novatrice l'une des premières à agir en même temps sur les deux pathologies principales présentes dans la maladie d'Alzheimer.

OBJECTIFS

Objectifs

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'accumulation de peptides A β toxiques et l'agrégation anormale de la protéine Tau dans le cerveau, menant à une atrophie cérébrale et un déclin des fonctions cognitives. Les molécules ciblant uniquement l'une des causes physiopathologiques de la MA restent majoritaires dans les essais cliniques, et exceptant l'Aducanumab qui a obtenu très récemment une autorisation de mise sur le marché (AMM) conditionnelle, obtiennent des résultats très limités dans les phases cliniques avancées d'évaluation. Au vu de l'accumulation de preuves suggérant une synergie entre les deux lésions, un traitement agissant à la fois sur les agrégats toxiques de peptides A β et sur les enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau semble être une stratégie thérapeutique prometteuse.

Puisque les molécules MSBD sont efficaces sur la pathologie Tau et la pathologie amyloïde *in cellulo* et *in vivo*, **mon premier objectif** a été de déterminer si l'effet lysomotropique et ses conséquences sur le blocage du lysosome et du flux autophagique était nécessaire pour l'effet thérapeutique des molécules ou si l'inhibition indirecte de la β -secrétase, enzyme clé de l'amyloïdogenèse, était suffisante pour agir à la fois sur la pathologie Tau et la pathologie amyloïde *in vivo*. Pour cela, j'ai utilisé deux molécules de la même famille qui diffèrent par un seul atome d'azote et qui pour l'une possède les deux activités lysomotropique et inhibitrice indirecte de la β -secrétase (la molécule MAGS) ou ayant uniquement cette dernière activité (la molécule PEL).

Mon second objectif a été d'étudier l'influence des deux molécules PEL et MAGS sur la quantité de peptide β -amyloïde agrégé, ainsi que leur impact sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau dans des modèles murins de tauopathie (THY-Tau22) et d'amyloïdogenèse (APP/PS1), afin de déterminer si ces molécules pouvaient posséder une efficacité *in vivo* sur les deux lésions principales de la pathologie Alzheimer dans une étude pré-clinique.

Grâce à ces deux molécules, nous disposons d'outils moléculaires permettant de mieux cerner l'activité pharmacologique nécessaire pour agir sur les deux processus pathophysiologiques de la MA. **Le dernier objectif** a donc été d'investiguer les mécanismes d'action de ces molécules anti-Alzheimer *in vivo* afin de définir sur quelles voies cellulaires et pathologiques ces molécules agissaient.

MATERIEL & MÉTHODES

Matériel et Méthodes

I. Les modèles transgéniques

Deux modèles de souris transgéniques ont été utilisés afin de mener à bien cette étude :

1.1 Le modèle THY-Tau22

Ce modèle murin de tauopathie hippocampique exprime l'isoforme hTau46 4R humaine mutée au niveau des acides aminés G272V et P301S sous contrôle du promoteur Thy1.2. (numérotation selon l'isoforme cérébrale de Tau humaine la plus longue, 441 acides aminés)(Schindowski et al., 2006). Le promoteur Thy1.2 dirige spécifiquement l'expression du transgène dans les neurones qui commence au jour postnatal 6 et n'affecte donc pas directement le développement embryonnaire. Ces souris sont hétérozygotes et développent, avec l'âge, des changements physiopathologiques caractéristiques des tauopathies, notamment une hyperphosphorylation et une phosphorylation anormale de Tau associées à des dégénérescences neurofibrillaires (Figure 27). La pathologie Tau dans ce modèle commence dans la zone CA1 de l'hippocampe dès 3 mois pour se propager ensuite dans le gyrus denté, l'amygdale et le néocortex, puis à l'ensemble du cortex avec l'âge. À 6 mois la pathologie est avérée, et elle atteint son maximum entre 10 et 12 mois (Van der Jeugd et al., 2013). L'avantage de ce modèle est de ne présenter aucun déficit moteur, malgré une désinhibition observée dans les tests d'anxiété, relative à la présence de dégénérescences neurofibrillaires dans l'amygdale.

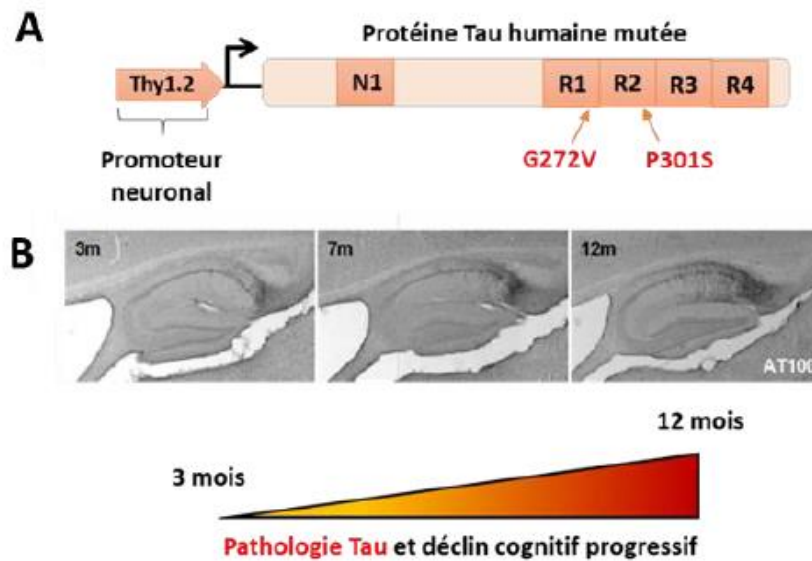


Figure 27 : **Le modèle murin THY-Tau22.** (A). Les souris THY-Tau22 expriment une protéine Tau humaine 4R mutée sur 2 sites (G272V et P301S), exprimée sous contrôle du promoteur neuronal THY1.2. (B). Les souris THY-Tau22 développent une pathologie Tau progressive à partir de 3 mois, avérée à 6-7 mois et maximale à 12 mois, qui commence dans l'hippocampe pour se propager au cortex. Elle est accompagnée d'un déclin cognitif progressif.

1.2 Le modèle APPswe/PS1dE9 (APP/PS1)

Le deuxième modèle utilisé au cours de cette étude est le modèle APPswe/PS1dE9 (nommé APP/PS1 dans la suite de l'étude). La nécessité d'obtenir des souris exprimant rapidement les symptômes de la maladie a mené à la création de modèles transgéniques doubles APPswe/PS1dE9 afin d'accélérer à la fois les dépôts d'A β et les déficits cognitifs. Ce modèle a été créé en co-injectant deux vecteurs codant pour un gène *APP* muté et un gène *PSEN1* muté (Jankowsky et al., 2001). La séquence *APP* code pour une APP chimérique souris/humaine (Mo/HuAPP695swe) qui a été « humanisée » en modifiant trois acides aminés et qui possède la mutation Swedish (KM670/671NL). La séquence *PSEN1* code pour la préséniline-1 humaine dépourvue de l'exon 9 (dE9). Le promoteur de la protéine prion de souris permet une expression neuronale des transgènes (Figure 28).

Ces mutations provoquent un dépôt d'A β commençant autour de 4 mois dans le cortex et 6 mois dans l'hippocampe. Les dépôts amyloïdes augmentent en taille et en nombre avec l'âge avec un maximum atteint vers 12 mois environ (Garcia-Alloza et al., 2006). Une augmentation du ratio A β 1-42/A β 1-40 est également observée. Les taux d'A β périphérique présentent des changements dépendant du sexe avec l'âge : entre 9 et 15 mois, les concentrations plasmatiques d'A β 40 et d'A β 42 augmentent chez les femelles mais diminuent chez les mâles (Ordóñez-

Gutiérrez et al., 2015). L'astrocytose se développe parallèlement au dépôt des plaques, avec une gliose sévère débutant vers 6 mois, en particulier au voisinage des plaques (Kamphuis et al., 2012). À 10 mois, les souris APP/PS1 montrent des déficits de mémoire spatiale (Minkeviciene et al., 2008). La perte neuronale est modeste dans ce modèle (Jackson et al., 2016a).

L'apparition de ces symptômes est plus rapide chez les femelles qui présentent une angiopathie cérébrale-amyloïde et une inflammation cérébrale plus sévères, ainsi qu'une dégénérescence synaptique et neuronale plus importante (Jiao et al., 2016). Dès l'âge de 6 mois, les souris APPswe/PSEN1dE9 sont hyperactives par rapport aux congénères non transgéniques (Onos et al., 2019), et il existe une probabilité élevée de crises d'épilepsie et de susceptibilité épileptique chez ces souris (Minkeviciene et al., 2009; Reyes-Marin and Nuñez, 2017).

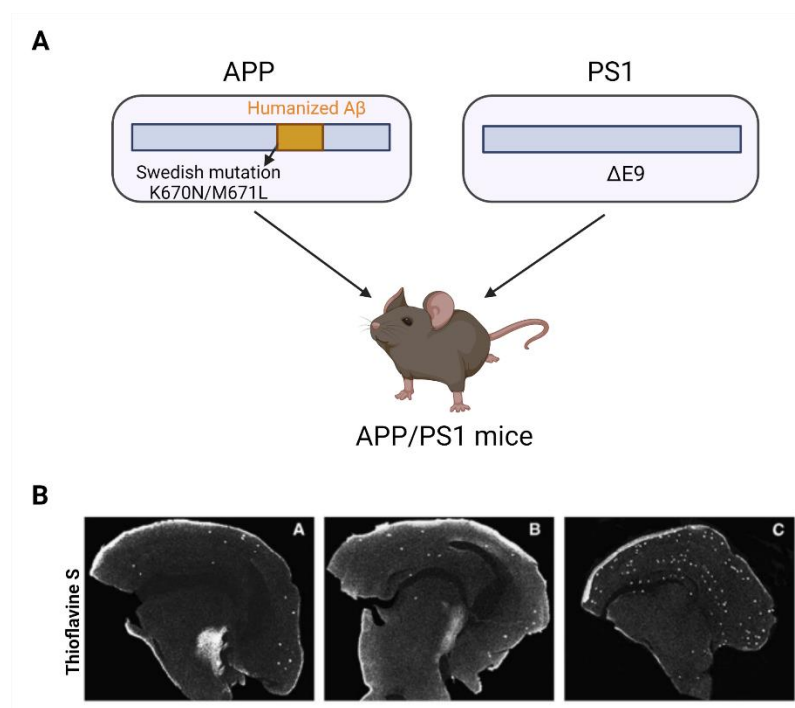


Figure 28 : **Le modèle murin APP/PS1.** (A) L'ADNc de l'APP, humanisé dans la région de l'Aβ et contenant la mutation Swedish au niveau des acides aminés 670/671 (APPswe), ainsi que l'ADNc du gène *PSEN1* sans l'exon 9 ont été cloné dans la souche C57Bl6 sous contrôle du promoteur murin PrP. (B) Marquage à la Thioflavine-S montrant l'évolution des plaques amyloïdes dans le cerveau des souris APP/PS1 à 4 mois [A], 6 mois [B] et 8 mois [C] (Garcia-Alloza et al., 2006).

II. Animaux

Pour l'étude sur les souris THY-Tau22, nous avons utilisé des femelles THY-Tau22 transgéniques et des souris de type sauvage (WT) de la même portée (fond génétique C57Bl/6J, Schindowski et al., 2006). Pour l'étude sur les APP/PS1, nous avons utilisé des mâles

hétérozygotes APPswe/PS1dE9 (C57Bl6/J background ; Jankowsky et al., 2001) et des souris WT de la même portée. Tous les animaux ont été hébergés dans une installation exempte d'agents pathogènes (EOPS) dans un cycle lumière-obscurité de 12/12 heures et maintenus à une température constante de 22°C, avec un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Les animaux ont été séparés par génotype et maintenus à 5 ou 6 par cage (Techniplast Cages 1284L) avec un enrichissement sous la forme d'un petit cylindre "cocon" et d'une cabane en plastique transparent (Techniplast SAFE Hut). Les animaux ont été utilisés conformément aux normes européennes pour l'utilisation des animaux de laboratoire et les expérimentations menées dans cette étude ont été autorisées par la Direction des Services Vétérinaires française avec le numéro d'enregistrement agréé APAFIS#10392-201706231206250v4.

III. Traitements avec les molécules

3.1 Les traitements des THY-Tau22 avec PEL et MAGS

Les composés **PEL** (3-(2-cyclohexylethoxy)-2'-((diméthylamino)méthyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-[1,1'-biphényl]-4-amine) et **MAGS** (4-(2-[(Diméthylamino)méthyl]phényl)-2-[2-(piperidin-1-yl)éthoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl] aniline) ont été synthétisés comme décrit dans Gay et al., 2018b par l'équipe du Pr. Patricia Melnyk (voir Figure 24). Une étude pilote a été effectuée sur des animaux WT traités pendant un mois afin d'établir l'innocuité des composés MAGS et PEL pour les doses de 1 et 5 mg/kg. Après le traitement des animaux, la concentration de PEL et MAGS a été mesurée dans le tissu cérébral. Pour l'étude principale, les animaux ont été aléatoirement distribués entre les groupes et à l'âge de 6 mois, les souris THY-Tau22 et WT ont été traitées pendant 6 semaines (Figure 29). Le traitement par MAGS ou PEL a été délivré dans l'eau de boisson des animaux à une concentration de 1 mg/kg, soit 12,5 µg/mL considérant que le poids moyen des souris est de 25 g et que les souris boivent 4 mL par jour. Les biberons ont été changés une fois par semaine car les solutions aqueuses des composés MAGS et PEL ont préalablement été démontrées stables pendant plus d'une semaine. Le volume de solution consommé par les souris a été mesuré tout au long de la période de traitement.

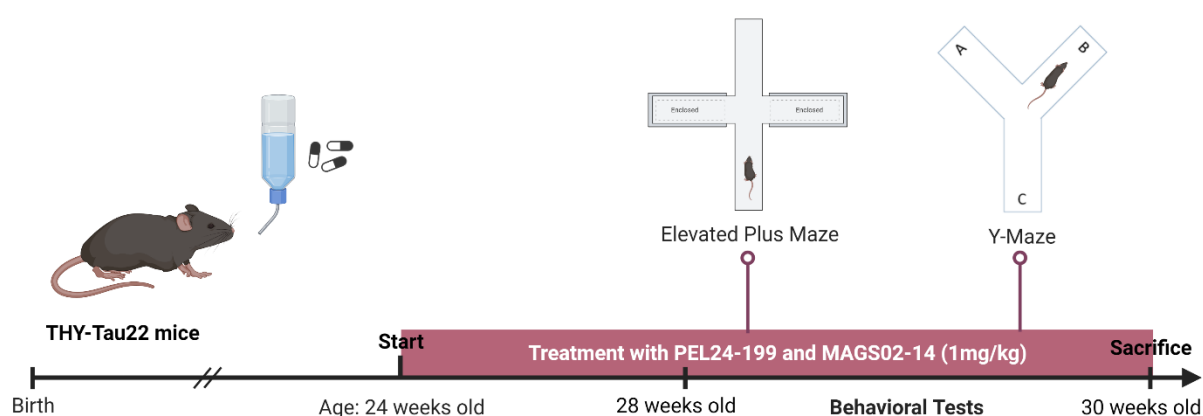


Figure 29 : Schéma illustrant le traitement administré aux souris THY-Tau22 et sa durée, ainsi que les tests comportementaux effectués avant le sacrifice. Les souris ont été traitées avec 1mg/kg de MAGS ou PEL dans l'eau de boisson pendant 6 semaines à l'âge de 6 mois, avant d'effectuer deux tests de comportement, le Labyrinthe en croix surélevé et le Y-Maze.

3.2 Le traitement des APP/PS1 avec PEL

Le composé **PEL** (3-(2-cyclohexylethoxy)-2'-((diméthylamino)méthyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-[1,1'-biphényle]-4-amine) a été synthétisé selon la procédure décrite précédemment dans Gay et al., 2018b par l'équipe du Pr. Patricia Melnyk. Pour cette étude, les souris APP/PS1 et WT ont été traitées à partir de l'âge de 8 mois durant 4 mois (Figure 30). Le traitement avec PEL a été délivré dans l'eau de boisson à une concentration finale de 1 mg/kg, soit 12,5 µg/mL en considérant un poids moyen de 25 g par souris buvant 4 mL par jour. Les biberons noirs opaques (Techniplast) ont été changés une fois par semaine car les solutions aqueuses du composé PEL s'étaient précédemment révélées stables à l'obscurité pendant plus d'une semaine. Une étude pilote avait été réalisée chez des animaux WT traités pendant un mois pour établir l'innocuité du composé PEL à la dose de 1 mg/kg et 5 mg/kg et évaluer que PEL était capable de passer la barrière hémato-encéphalique (Tautou et al., 2021). Le volume de solution consommé par les souris a été mesuré tout au long de la période de traitement.

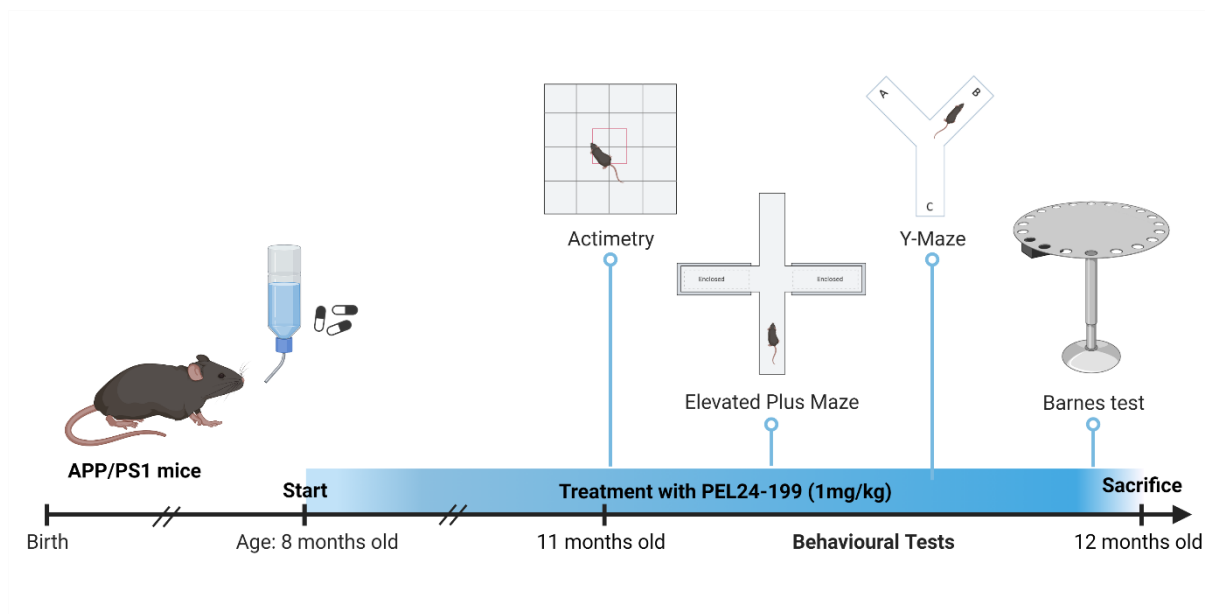


Figure 30 : **Représentation temporelle du traitement des souris APP/PS1 et des tests comportementaux.** Les souris ont été traitées à partir de l'âge de 8 mois pendant 4 mois avec 1 mg/kg de PEL et les tests comportementaux (Actimétrie, Labyrinthe en croix surélevé, Y-Maze et test de Barnes) ont été réalisés à 11 mois et les souris ont été sacrifiées à 12 mois.

IV. Tests de comportement

4.1 Motricité

Toutes les procédures comportementales ont été effectuées en aveugle au traitement administré. Les souris ont été placées au centre d'un Actimètre infrarouge (45x45x35cm ; Bioseb), composé d'un cadre carré bidimensionnel, et laissées libres d'explorer l'arène pendant 10 min. Le comportement spontané des souris a été suivi et la distance parcourue ainsi que la vitesse ont été enregistrées grâce au logiciel Actitrack (Bioseb).

4.2 Anxiété

L'anxiété, qui pourrait interférer avec les tests de mémoire, a été évaluée chez les animaux traités et non traités grâce au test du Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM). Les souris ont été placées au centre du labyrinthe en forme de croix composé de deux bras ouverts de 10 cm de large et de deux bras fermés de 10 cm de large surélevés à 50 cm au-dessus du sol. Les paramètres comprenant le nombre d'entrées dans chaque bras, le temps passé dans les bras ouverts par rapport aux bras fermés et le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts

ont été mesurés pendant 5 minutes et acquis par enregistrement vidéo à l'aide du logiciel de suivi vidéo EthoVision (Noldus Information Technology, Paris, France).

4.3 Mémoire spatiale à court-terme

La mémoire spatiale à court-terme a été évaluée à l'aide du test du labyrinthe en Y. Ce test consiste en trois bras fermés de 10 cm de large et est entouré de quatre repères spatiaux. L'un des deux bras opposés au bras de départ (S) a été fermé pendant la phase d'apprentissage. Chaque souris a été positionnée dans le bras de départ et laissée libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 min. Puis pendant la phase de rétention de 2 min, la souris a été remise dans sa cage. Pendant la phase de test de 5 min, le bras fermé a été ouvert, et la souris a été placée dans le bras de départ. Le bras précédemment fermé a été nommé « Nouveau bras » et le bras déjà ouvert a été nommé « Autre bras ». Les paramètres - distance totale parcourue, vitesse, alternance entre les bras, entrées dans les trois bras - ont été mesurés pendant 5 min. Le test de mémoire spatiale à court terme était considéré comme réussi lorsque la proportion d'entrées dans le nouveau bras était plus élevée que le temps passé dans l'autre bras déjà exploré.

4.4 Mémoire spatiale à long-terme

La mémoire à long terme a été évaluée à l'aide de la tâche du labyrinthe de Barnes (Barnes, 1979). Le labyrinthe de Barnes est une plate-forme circulaire ouverte en PVC blanc (120 cm de diamètre) avec 40 trous équidistants (5 cm de diamètre) situés à 5 cm du bord et une boîte "refuge" noire opaque située sous l'un des 40 trous. La plate-forme est placée au centre de la pièce, élevée à 80 cm au-dessus du sol, éclairée par une lumière intense (800 lux) et entourée de repères visuels sur les 4 murs. La veille de la phase d'entraînement, les souris ont effectué un essai pour se familiariser avec l'environnement du labyrinthe et s'entraîner à entrer dans la boîte noire "refuge". Les souris sont autorisées à explorer librement la plate-forme et la boîte noire pendant 5 min. Ensuite, les souris ont effectué une phase d'entraînement de 4 jours avec 4 essais par jour et un intervalle entre les essais de 15 min. Au début de chaque essai, les souris ont été placées dans une chambre de départ en PVC gris située au centre du labyrinthe. Après une période de 15 secondes, la chambre de départ est soulevée et la souris est entraînée à localiser le trou cible sous lequel la boîte "refuge" est placée (randomisé pour toutes les souris) à l'aide des repères visuels entourant le labyrinthe. Si une souris n'entrait pas dans le trou cible dans les 3 min, elle était doucement amenée vers le trou cible et restait 1 min dans la boîte "refuge" avant d'être replacée dans sa cage. Pour chaque essai, le nombre total d'erreurs et la latence totale pour trouver le trou cible et entrer dans la boîte ont été enregistrés à l'aide du

système de suivi vidéo Ethovision XT (Noldus). Pour réduire les indices liés aux odeurs sur le labyrinthe, celui-ci a été tourné dans le sens des aiguilles d'une montre d'un quart de tour chaque jour et la surface du labyrinthe et la boîte noire ont été nettoyées avec de l'éthanol après chaque essai. 72 h après le dernier jour d'entraînement, les souris ont effectué la phase de test pendant 2 min, durant lesquelles la boîte noire avait été retirée. Le temps passé dans le quadrant cible ("quadrant cible") par rapport au temps passé en moyenne dans les quadrants non-cibles ("autres") a été déterminé.

V. Sacrifice et préparation des tissus cérébraux

Les souris ont été sacrifiées par décapitation afin d'éviter une influence de l'anesthésie sur la phosphorylation de la protéine Tau (Le Freche et al., 2012) et le sang a été recueilli au niveau du cou dans des tubes héparinés. Les cerveaux ont été prélevés et un hémisphère a été post-fixé pour l'immunohistochimie dans une solution à 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS (pH 7,4) durant une semaine à 4 °C puis transféré dans une solution à 20 % de sucrose pendant une nuit avant d'être congelé. Le cortex et l'hippocampe de l'autre moitié du cerveau ont été disséqués, disposés dans des tubes d'isopropylène de 1,5 mL, puis congelés par immersion dans une solution d'isopropanol additionnée de carboglace. Le tissu cérébral a été conservé à -80°C jusqu'à ce qu'il soit utilisé pour les analyses biochimiques. Les échantillons de cortex et d'hippocampe ont été additionnés de 200 µL de tampon tris-sucrose (TSB) (tris-HCl 410 mM, pH 7,4 avec 10 % de sucrose) et ont été soniqués (40 impulsions, amplitude 60, 0,5 kHz). Un dosage BCA a été utilisé pour déterminer la concentration en protéines des échantillons et chaque échantillon a été préparé à une concentration finale de 1 mg/mL dans du TSB.

VI. SDS-PAGE et Western Blot

4.1 Etude de la phosphorylation de la protéine Tau dans les THY-Tau22

Pour chaque lysat, 8 µg de protéines totales ont été chargés par puits sur les gels de polyacrylamide pré-coulés 26 puits Criterion™ XT Bis-Tris 12 % (Bio-Rad) afin d'étudier la phosphorylation de Tau. Des gels de polyacrylamide 18 puits Criterion™ XT Bis-Tris 4-12 % ont été utilisés pour toutes les autres analyses western blot. Pour la migration, une cellule Criterion™ et le tampon de migration MOPS SDS (1X) NuPAGE™ ont été utilisés. Les électrophorèses ont été réalisées en appliquant une tension continue de 100 V par gel pendant

60 min. La calibration des poids moléculaires des protéines a été déterminée à l'aide des marqueurs de poids moléculaire Novex et Magic Marks (Life Technologies). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,4 μ M (GE Healthcare) en utilisant le système de blotting de Criterion™ et en appliquant une tension continue de 100 V pendant 40 min. La qualité de l'électrophorèse et du transfert de protéines a été déterminée par une coloration au rouge Ponceau réversible des protéines transférée sur la membrane de nitrocellulose (0,2 % de xylidine Ponceau 2R et 3 % d'acide trichloracétique). Après plusieurs lavages sous une eau déminéralisée, les membranes ont été saturées pendant 1 h dans le tampon TBS-T (25 mM tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20 (v/v) avec 5 % (p/v) de lait écrémé (TBS-M) ou 5 % (p/v) de sérum albumine bovine (TBS-BSA). Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4 °C. Les conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires sont résumées dans l'Annexe 1. Les membranes ont été rincées 3 fois pendant 10 min avec le TBS-T, puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 45 min à température ambiante. Les complexes immunoréactifs ont été révélés en utilisant soit de l'ECL™ ou de l'ECL™ Prime (Cytiva), selon les recommandations du fabricant. Les images et le signal émis ont été acquis avec le système LAS-3000 (Fuji). Les quantifications de l'expression des protéines ont été calculées grâce au logiciel ImageQuant™ TL, et les valeurs pour chaque échantillon ont été divisées par les valeurs de la protéine de ménage, la GAPDH. Les valeurs pour les échantillons des conditions traitées ont été divisées par les valeurs des échantillons de contrôle pour exprimer les résultats en tant que pourcentage de la condition non traitée.

4.2 Etude de la quantité de protéine APP et de ses métabolites dans les APP/PS1

1 volume de tampon d'échantillon NuPAGE LDS 2X additionné de 20 % d'agents réducteurs d'échantillon NuPAGE (Invitrogen) a été ajouté aux échantillons qui ont ensuite été chauffés 10 min à 70 °C. 15 g de protéines par puits ont été chargés sur des gels précoulés 4-12% Criterion™XT bis-tris polyacrylamide 18 puits (Bio-Rad) et l'électrophorèse a été réalisée en appliquant une tension de 200V pendant 60 min à l'aide d'une cuve Criterion™ avec le tampon NuPAGE MOPS (1X). L'étalonnage des poids moléculaires a été réalisé en utilisant les marqueurs de poids moléculaire Novex et Magic Marks (Life Technologies). Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,4 μ M (G&E Healthcare) en utilisant le système de transfert Criterion™ et en appliquant une tension de 100 V pendant 40 min. Pour la détection des métabolites APP (A β et CTF), des gels précoulés 16,5% Criterion™XT bis-tris polyacrylamide 18 puits (Bio-Rad) ont été utilisés avec le tampon tris-

Tricine (BioRad) et l'électrophorèse a été réalisée en appliquant une tension de 150 V pendant 2 h. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 μ M (G&E Healthcare) en utilisant le système de transfert Criterion™ et en appliquant une tension de 100 V pendant 30 min. Le transfert et la qualité des protéines ont été déterminés par une coloration réversible au rouge Ponceau (0,2 % de xylidine rouge Ponceau et 3 % d'acide trichloracétique). Les membranes ont été saturées pendant 1 h dans 25 mM de tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,1 % de Tween-20 (v/v) (TBS-T) et 5 % (p/v) de lait (TBS-M) ou 5 % (w/v) d'albumine de sérum bovin (TBS-BSA) selon l'anticorps. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4 °C. Les conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires sont résumées dans l'Annexe 2. Les membranes ont été rincées 3 fois 10 min avec du TBS-T puis incubées avec les anticorps secondaires pendant 45 min à température ambiante. Les complexes immunoréactifs ont été révélés à l'aide de l'ECL™ ou de l'ECL™ Prime (Cytiva) en suivant les instructions du fabricant. Les images et le signal des protéines ont été acquis avec le système LAS-3000 (Fuji). Les quantifications de l'expression des protéines ont été calculées avec le logiciel ImageQuant™ TL et les valeurs pour chaque échantillon ont été divisées par les valeurs de la protéine de ménage GAPDH. Les valeurs semi-quantitatives pour les échantillons des conditions traitées ont été divisées par les valeurs semi-quantitatives des échantillons témoins pour exprimer les résultats en pourcentage de la condition non traitée.

VII. Préparation de la fraction de Tau insoluble

Les homogénats de tissus cérébraux dans le tampon TSB (fraction crude) ont été centrifugés à 14 000 tours/min pendant 10 min (Centrifuge 5424R, Eppendorf). Le surnageant (fraction S1) a été complété avec du TSB jusqu'à un volume final de 600 μ L et soniqué (40 impulsions de 0,5 s, amplitude 40 %, 20 kHz). Les homogénats de tissus cérébraux ont ensuite été centrifugés à 49 000 tr/min pendant 1 h (Ultracentrifugeuse Optima TLX équipée d'un rotor TLA-110, Beckman). Le surnageant a été récupéré et le culot a été resuspendu dans 600 μ L d'une solution de tris-Triton 2% (tris-HCl 10 mM pH 7,4, 2% Triton X-100) (fraction S2). Les échantillons S2 ont ensuite été soniqués et centrifugés de nouveau à 49 000 tr/min pendant 1 h. Le surnageant obtenu (fraction S3) a été récupéré et le culot (C3) a été remis en suspension dans un volume de tampon LDS 2X NuPAGE™ complété par un agent réducteur NuPAGE™ (10x) (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Le protocole standard de Western blot NUPAGE™ a ensuite été utilisé, et 8 μ L de fraction Crude, 10 μ L de fraction S1, 15 μ L de

fraction S2 et de fraction S3, et 20 μ L de C3 ont été chargés par puits. Le signal en Western blot a été acquis en utilisant un LAS-3000 (Fuji) et les niveaux d'expression des protéines ont été déterminés à l'aide du logiciel ImageQuantTL. Les résultats ont été exprimés sous forme de rapport entre la quantité de protéines présentes dans la fraction insoluble divisée par le signal protéique détecté dans la fraction soluble ajoutée à celle mesurée dans la fraction insoluble (Figure 31).

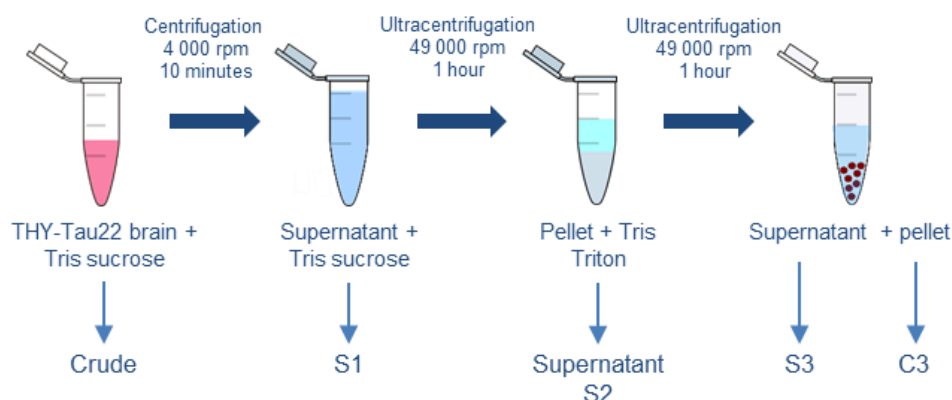


Figure 31 : **Représentation schématique des étapes de fractionnement utilisées pour obtenir la fraction insoluble de Tau dans le tissu cérébral des souris THY-Tau22.** Les échantillons dans le tampon tris-sucrose (crude) sont centrifugés, et le surnageant est additionné de 10 % de tampon tris-sucrose (S1), et soniqué avant d'être centrifugé à $100\,000 \times g$. Le surnageant est collecté (S2) et le culot est remis en suspension dans du tampon tris-triton X-100, soniqué puis centrifugé à $100\,000 \times g$ pendant 1 h. Le surnageant (S3) est recueilli, et le culot est remis en suspension dans du tampon LDS (C3). Chaque fraction de S1 à C3 et le lysat cérébral brut sont ensuite chargés sur gel SDS-PAGE.

VIII. Électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle de la protéine Tau a été effectuée comme décrit par (Sergeant et al., 2017). Brièvement, 15 μ g de protéines de cortex ou d'hippocampe (pool de cinq souris pour chaque groupe), ont été ajoutés à 15 μ L de Tris 20 mM contenant 2 % de SDS et chauffés à 100 °C pendant 5 min. Les protéines ont ensuite été précipitées avec 10 volumes d'acétone à -20 °C et incubées à -20 °C pendant 20 min, puis centrifugées à 14 000 g pendant 10 min. Les surnageants ont été retirés et les culots de protéines ont été laissés à sécher 1 h à température ambiante avant d'être remis en suspension dans 200 μ L de tampon IEF (8 M d'urée, 2 M de thiourée et 4 % de CHAPS). Les échantillons ont été soniqués (40 impulsions de 0,5 s, amplitude 40 %, 20 kHz) sur de la glace, et dans chaque tube a été ajouté le tampon d'électrophorèse 2D (1,1 μ L de tampon IPG pH 3–11, 2,2 μ L de solution de réhydratation DeStreak (Cytiva) et une trace de bleu de bromophénol). Ensuite, les échantillons ont été

chargés sur des bandelettes IPG de 11 cm Cytiva (pH 3–11) recouvertes d'huile minérale et ont été laissés se réhydrater passivement sur la nuit. Les bandes IPG ont ensuite été chargées dans un Ettan™ IPGphor™ Manifold (Cytiva), et l'isoélectrofocalisation a été réalisée en appliquant 0,5 kV pendant 1 h, 1 kV pendant 1 h, et 6 kV pendant 2 h (pour chaque expérience, les échantillons sont traités dans le même cycle d'IEF). Les bandes IPG ont ensuite été équilibrées trois fois (10 min chacune) dans un tampon d'équilibrage (25 mM tris-HCl pH 6,8, 20 mM DTT, 10 % glycérol, 5 % de SDS et 0,05 % de bleu de bromophénol) et ont été déposées sur un gel de polyacrylamide bis-tris Criterion XT 4-12 % pré-coulé. L'électrophorèse SDS-PAGE a ensuite été réalisée selon le protocole de Western blot décrit précédemment. Les isovariants de la protéine Tau ont été détectés grâce à l'anticorps anti-Tau Cter.

IX. Immunohistochimie, immunofluorescence et analyse d'images

9.1 Quantification de la dégénérescence neurofibrillaire et de l'inflammation dans les THY-Tau22

Immunohistochimie visible

Des coupes flottantes coronales de cerveaux de 40 µm ont été obtenues grâce à un cryostat (CM3050 S, Leica). Les coupes d'hippocampes ont été sélectionnées en fonction des règles de stéréologie et ont été stockées dans du PBS (phosphate buffer saline) avec 0,2% d'azoture de sodium à 4°C. Pour les immunohistochimies visibles avec les anticorps anti-phospho-Tau et GFAP, les coupes coronales de cerveaux ont été perméabilisées avec une solution à 0,2% de Triton X-100 dans du PBS. Les coupes ont ensuite été incubées avec solution à 0,3 % de peroxyde d'hydrogène et saturées avec 10 % de sérum MOM ("Mouse on Mouse") (ZFO513, Vector Laboratories) pendant 1 h, avant l'incubation avec l'anticorps anti-Tau primaire ou anti-GFAP une nuit à 4°C. Les anticorps utilisés dans cette étude sont répertoriés dans l'Annexe 1. Après lavage dans du PBS, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire IgG anti-souris ou anti-lapin biotinylé pendant 1 h. Ensuite, les sections ont été incubées avec le Kit ABC (Avidine/Biotine Complex, Vector Laboratories) pendant 2 h et le marquage a été révélé à l'aide de DAB (Sigma) avant d'être rincé avec une solution physiologique. Les coupes de cerveau ont été montées sur lames en verre (Superfrost Plus, ThermoScientific) et déshydratées par bains séquentiels dans de l'éthanol à 30, 70, 95 et 100 % pendant 5 min. Ensuite, les lames

ont été immergées dans une solution de toluène pendant 15 min et fixées avec du milieu de montage (Support de montage permanent VectaMount H-5000, Vector Laboratories) et des lamelles en verre. Les images ont été acquises à l'aide d'un Axioscan Zeiss slidescan Z1, et la quantification des neurones contenant des DNF a été effectuée en comptant le nombre de neurones marqués dans la zone CA1 de l'hippocampe, pour trois coupes antéropostérieures en moyenne sélectionnées selon le Mouse Brain Allen dans une moyenne de quatre souris pour chaque groupe.

Immunofluorescence

Pour les études d'immunofluorescence, des coupes coronales du cerveau ont été perméabilisées avec une solution à 0, 2% de Triton X-100 dans du PBS et bloquées avec du sérum de chèvre (1/100 ; S1000 Vector Laboratoires) dans du PBS pendant 1 h avant incubation avec un anticorps anti GFAP et anti- τ 422 à 4°C sur la nuit. Après les lavages, les sections ont été incubées avec l'anticorps secondaire AlexaFluor 568 IgG de chèvre anti-souris et AlexaFluor 488 IgG de chèvre anti-lapin dans 0,2% de Triton X-100 dans du PBS pendant 1 h. Les sections ont ensuite été incubées avec le DAPI (1/5000 ; Sigma-Aldrich) pendant 5 min et montées sur des lames en verre (Superfrost Plus, ThermoScientific). Les sections ont finalement été traitées avec 0,3 % de Noir Soudan (Millipore 2160) pendant 5 min et lavées avec de l'éthanol à 70 % pour bloquer l'autofluorescence. Les images ont été acquises à l'aide d'un Axioscan Zeiss slidescan Z1 à fluorescence. La quantification du marquage GFAP et τ 422 a été réalisé à l'aide du logiciel NIH ImageJ et d'une macro personnalisée. Le nombre de neurones contenant de la DNF marqués par l'anticorps phospho-Tau τ 422 et la surface de marquage GFAP sont toutes deux exprimées sous forme de ratio par rapport à la surface de l'hippocampe (en mm²).

9.2 Quantification des plaques amyloïdes et de l'inflammation dans les APP/PS1

Immunohistochimie visible

Les anticorps utilisés dans cette étude sont répertoriés dans l'Annexe 2. Des coupes flottantes coronales de cerveaux de 40 μ m ont été obtenues grâce à un cryostat (CM3050 S, Leica). Les coupes d'hippocampes ont été sélectionnés en fonction des règles de stéréologie et ont été stockés dans du PBS (phosphate buffer saline) avec 0,2 % d'azoture de sodium à 4°C. Pour l'immunohistochimie A β , les sections ont été lavées avec 0,2 % de Triton X-100 dans du PBS

afin de les perméabiliser. Les coupes ont été incubées avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,3 % (1/100 ; #16911, Sigma) et prétraitées avec de l'acide formique à 80 % pendant 3 min. Les coupes ont ensuite été saturées avec du sérum de chèvre (1/100; S1000, Vector Laboratories) dans du PBS pendant 1h avant incubation avec un anticorps souris biotinylé anti-A β (4G8) à 4 °C pendant une nuit. Pour l'immunohistochimie GFAP, les sections ont été lavées avec 0,2% de Triton X-100 dans du PBS afin de les perméabiliser, incubées avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,3% (1/100; #16911, Sigma) puis bloquées avec 5% de sérum de chèvre (S1000, Vector Laboratoires) dans du PBS pendant 1h. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps lapin anti-GFAP à 4°C pendant une nuit, avant d'être traitées avec un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (BA-1000, Vector Laboratories) pendant 1 h. Après lavage avec 0,2% Triton X-100 dans du PBS, toutes les coupes ont été incubées avec le kit ABC (Avidine/Biotine Complex, Vector Laboratories) pendant 2h et développées avec de la DAB (Sigma) avant d'être rincées dans du sérum physiologique. Les coupes de cerveau ont été montées sur des lames en verre (Superfrost Plus, ThermoScientific) et déshydratées par des bains séquentiels dans 30 %, 70 %, 95 % et 100 % d'éthanol pendant 5 min. Ensuite, les lames ont été immergées dans du toluène pendant 15 min et fixées avec du milieu de montage (VectaMount Permanent Mounting Medium H-5000, Vector Laboratories) et des lamelles en verre. Les images ont été acquises à l'aide d'un Axioscan.Z1 Zeiss slidescan et la quantification du nombre de plaques, la classification des plaques en fonction de leur taille et de la zone couverte par le marquage GFAP dans l'hippocampe des souris APP/PS1 ont été effectuées à l'aide d'une macro personnalisée.

Immunofluorescence

Pour les études d'immunofluorescence, les coupes coronales de cerveau ont été perméabilisées avec 0,2 % de Triton X-100 dans du PBS et bloquées avec du sérum de chèvre (1/100 ; S1000 Vector Laboratories) pendant 1 h avant incubation avec un anticorps anti-GFAP à 4 °C sur la nuit. Après les lavages, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire AlexaFluor 568 IgG de chèvre anti-lapin (A11011; Thermo-Fisher) dans 0,2 % de Triton X-100 dans du PBS pendant 1 h. Les coupes ont ensuite été incubées avec du DAPI (1/5000 ; Sigma-Aldrich) pendant 5 min et montées sur des lames en verre. Pour visualiser les plaques amyloïdes, les coupes ont été incubées avec une solution à 1 % de thioflavine-S dans de l'eau pendant 30 min puis lavées avec des bains séquentiels d'éthanol à 80 % et 90 %. Les coupes ont finalement été traitées avec 0,3 % de Noir Soudan (Millipore 2160) pendant 5 min et lavées avec de l'éthanol à 70 % pour bloquer l'autofluorescence. Les images ont été acquises à l'aide d'un slidescan

Fluorescence Zeiss Axioscan.Z1. La quantification du marquage GFAP et des plaques amyloïdes a été réalisée avec une macro personnalisée. Le nombre de plaques et la surface couverte par les plaques amyloïdes ont été calculés dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1. Une moyenne de 6 coupes antéropostérieures a été sélectionnée selon l'atlas cérébral de la souris Allen chez 4 souris en moyenne pour chaque condition.

X. Extraction d'ARNm et analyse PCR quantitative en temps réel

L'ARN total a été extrait des échantillons de cortex et d'hippocampes et purifié à l'aide du RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Les ARN extraits ont été quantifiés grâce au spectrophotomètre NanoDropOne (Thermo Fisher Scientific) et les rapports d'absorbance à 260/280 nm et 260/230 nm ont été mesurés afin de contrôler la pureté des échantillons d'ARN. 500 ng d'ARN total ont été rétro-transcrits en utilisant le High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, 4368814) dans un volume de 20 µL. Les conditions suivantes ont été appliquées au thermocycleur : 10 min à 25 °C, 120 min à 37 °C suivies de 5 min à 85 °C. Les réactions de RT-qPCR ont été réalisées dans un Real Time PCR System StepOnePlus (Applied Biosystems). Chaque réaction a été réalisée en duplicat dans des plaques 96 puits (Applied biosystems) dans un volume réactionnel de 10 µL. Toutes les réactions contenaient 2 µL d'ADNc et 8 µL de SybrGreen mix (5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems), 0,1 µL de chaque amorce et 2,8 µL d'eau ultra-pure). Le protocole de la réaction commence par une étape de dénaturation initiale de 10 min à 95 °C, suivie de 40 cycles de 95 °C pendant 15 s, puis d'une étape à 60 °C pendant 25 s. Par la suite, la courbe de fusion a été vérifiée par amplification d'un seul produit, qui a été généré en commençant à 95 °C pendant 15 s, puis à 60 °C pendant 1 min et en augmentant de 1 °C toutes les minutes pour atteindre 95 °C pendant 15 s. Chaque expérience incluait des contrôles négatifs et des contrôles internes. La cyclophiline A a été utilisée comme gène de référence et l'expression relative des gènes cibles a été déterminée par la méthode $\Delta\Delta CT$. Les séquences d'amorces utilisées sont indiquées dans la Figure 32.

Primers	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length
CCL3	NM_011337.2	5'-TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT-3'	5'-GTGGAATCTCCGGCTGTAG-3'	112
CCL4	NM_013652.2	5'-GCCCTCTCTCTCTCTTGCT-3'	5'-GAGGGTCAGAGCCATTG-3'	72
CLEC7A	NM_020008.2	5'-ATGGTTCTGGGAGGATGGAT-3'	5'-GCTTCTCTGGGAGCTGTAT-3'	72
CONNEXIN43	NM_010288.3	5'-GTGCCGGCTTCACTTTCA-3'	5'-GGAGTAGGCTTGACCTTGTG-3'	97
C1QA	NM_007572.2	5'-GGAGCATCCAGTTTGATCG-3'	5'-CATCCCTGAGAGGTCTCCAT-3'	60
C3	NM_009778.3	5'-CAGCCTTCGTCCTCATCG-3'	5'-ATGCTCCAGGAAGGCTATT-3'	76
GFAP	NM_001131020.1	5'-CGCGAACAGGAAGAGCGCCA-3'	5'-GTGGCGGGCCATCTCTCTCT-3'	104
ITGAX	NM_021334.2	5'-ATGGAGCCTCAAGACAGGAC-3'	5'-GGATCTGGGATGCTGAAATC-3'	62
LCN2	NM_008491.1	5'-CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT-3'	5'-TCTGATCCAGTAGCGACAGC-3'	89
TLR2	NM_011905.3	5'-GGGGCTTCACTTCTCTGCTT-3'	5'-AGCATCCTCTGCGATTGACG-3'	110
CYCLOPHILIN A	NM_008907.1	5'-AGCATACAGGTCTGGCATC-3'	5'-TTCACCTTCCCAAGACCAC-3'	126

Figure 32 : **Tableau des primers utilisés en qPCR.** Le numéro, la séquence sens et anti-sens ainsi que la taille des primers sont recensés dans ce tableau.

XI. Dosages ELISA

11.1 Dosage de la quantité de Tau totale dans le plasma des THY-Tau22

Les échantillons de sang en tubes héparinés ont été centrifugés à 10 000 tr/min pendant 15 min (Centrifuge 5424R, Eppendorf), et le plasma a été récupéré. Les taux plasmatiques de protéine Tau humaine totale ont été obtenus à l'aide d'un kit ELISA (Total Tau ELISA, EuroImmun, EQ6531-9601-L), suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 100 µL par puits de solution de biotine ont été incubés avec 25 µL d'échantillons, d'étalons et de contrôles pendant 3 h à température ambiante. La plaque ELISA a été rincée à l'aide du tampon de lavage, et 100 µL par puits de conjugué enzymatique ont été ajoutés pendant 30 min. Les puits ont été rincés à nouveau, et 100 µL par puits de chromogène/substrat ont été incubés pendant 30 min à l'abri de la lumière. 100 µL de solution d'arrêt de la réaction ont été ajoutés par puits, et l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de plaques spectrophotométrique Multiskan Ascent (ThermoLab Systems). Les quantités de Tau totale dans le plasma ont été évaluées en se référant à la courbe standard du fabricant et exprimé en pg/mL.

11.2 Dosage des A β 1-40 et A β 1-42 dans le plasma des APP/PS1

Les échantillons de sang dans des tubes héparinés ont été centrifugés à 10 000 rpm pendant 15 min (Centrifuge 5424R, Eppendorf), et le plasma a été collecté. Les taux plasmatiques d'A β 1-40 et d'A β 1-42 ont été mesurés à l'aide de kits ELISA (Plasma Beta-Amyloid 1-40 ELISA, EuroImmun, EQ6511-9601 et Plasma Beta-Amyloid 1-42 ELISA, EuroImmun, EQ6521-9601) en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 25 μ L des échantillons ont été dilués dans 175 μ L du tampon de dilution. Ensuite, 20 μ L de solution de biotine par puits ont été incubés avec 80 μ L des échantillons dilués, des calibrateurs et des contrôles pendant 3h à température ambiante. La plaque ELISA a été lavée en utilisant le tampon de lavage et 100 μ L par puits de conjugué enzymatique ont été ajoutés pendant 30 min. Les puits ont été à nouveau lavés et 100 μ L par puits de chromogène/substrat ont été incubés pendant 30 min à l'abri de la lumière. 100 μ L de solution d'arrêt par puits ont été ajoutés pour arrêter la réaction et l'absorbance à 450 nm a été mesurée par le spectrophotomètre Multiskan Ascent (ThermoLab Systems). Les quantités d'A β 1-40 et d'A β 1-42 dans le plasma ont été évaluées en se référant à la courbe étalon du fabricant et exprimées en pg/mL.

11.3 Dosage des A β 1-40 et A β 1-42 dans le tissu cérébral des APP/PS1

Pour chaque échantillon, 20 μ g de protéine ont été dilués dans du TBS dans un volume de 20 μ L à une concentration finale de 1 mg/mL. Les échantillons ont été additionnés de 160 μ L de solution de guanidine/Tris (guanidine-HCl 5 M, Tris 50 mM, pH 8) et ont été soniqués (30 impulsions, amplitude 40, 0,5 kHz). Les échantillons ont été homogénéisés pendant 3 h à température ambiante. Ensuite, les échantillons ont été dilués au 1:5 dans du tampon BSAT (2,5 mM de KCl, 1,5 mM de KH₂PO₄, 135 mM de NaCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 5 % de BSA, 0,03 % de Tween-20, pH 7,4) dans un volume total de 500 μ L, et ont été centrifugé à 16 000 g (Centrifuge 5424R, Eppendorf) pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant a ensuite été transféré dans des plaques ELISA. Les taux d'A β 1-40 et d'A β 1-42 ont été mesurés dans les tissus du cortex et de l'hippocampe à l'aide de kits ELISA (Human A β 40 ELISA kit; KHB3481 and Human A β 42 ELISA kit; KHB3441, Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les échantillons ont été dilués au 1:5 dans le tampon de dilution fourni et 50 μ L des échantillons, des contrôles et des standards ont été incubés avec 50 μ L de l'anticorps de détection pendant 3 h à température ambiante. La plaque a ensuite été lavée 4 fois avec le tampon de lavage et les échantillons ont été incubés avec 100 μ L d'IgG HRP anti-lapin pendant

30 min à température ambiante. La plaque a été lavée 4 fois de nouveau avec le tampon de lavage et 100 μ L de chromogène stabilisé ont été ajoutés à chaque puits et incubés 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Ensuite, 100 μ L de la solution d'arrêt ont été ajoutés afin de stopper la réaction et l'absorbance à 450 nm a été mesurée avec le spectrophotomètre Multiskan Ascent (ThermoLab Systems). Les quantités d'A β 1-40 et d'A β 1-42 dans les tissus cérébraux ont été évaluées en se référant à la courbe étalon du fabricant et exprimées en pg/mL.

11.4 Dosage des oligomères A β dans le tissu cérébral des APP/PS1

Les niveaux d'oligomères A β ont été mesurés avec le Human Amyloid β Oligomers (82E1-specific) Assay Kit (#27725, IBL). Les échantillons ont été dilués au 1 :50^e dans le tampon EIA, et 100 μ L d'échantillons, de contrôles et de standards ont été ajoutés dans les puits de la plaque d'incubation primaire. Ensuite, 20 μ L de l'anticorps dilué ont été ajoutés aux puits et la plaque a été incubée pendant 1 h à 4°C. 100 μ L de chaque puits ont été prélevés de la plaque d'incubation primaire et mis dans la plaque pré-coatée puis incubés pendant 1 h à 4°C. La plaque a été successivement lavée 5 fois et 100 μ L de chromogène (solution de TMB) ont été ajoutés dans les puits avant que la plaque ne soit incubée 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Ensuite, 100 μ L de la solution Stop ont été ajoutés aux puits pour arrêter la réaction et l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de plaque spectrophotomètre Multiskan Ascent (ThermoLab Systems). Les taux d'oligomères A β dans le tissu cérébral ont été évalués en se référant à la courbe standard du fabricant et exprimés en pmol/L.

XII. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Les différences entre la moyenne des valeurs ont été déterminées à l'aide du t-test de Student ou d'un U-Test de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4.2. Les comparaisons entre plusieurs séries de données ont été faites grâce à un One Way ANOVA ou Two-Way ANOVA. Les valeurs avec une p value < 0,05 ont été considérées comme significatives, avec * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001, et **** : p < 0,0001.

RESULTATS

Résultats

I. Etude de l'activité de PEL et MAGS sur le modèle THY-Tau22

Le but de cette première étude était de mettre en évidence laquelle des activités de MAGS et PEL, l'activité lysosomotropique ou l'activité de modulation de la β -secrétase, était nécessaire pour avoir une efficacité sur la pathologie Tau dans un modèle THY-Tau22, et si ces molécules pouvaient atténuer les lésions présentes dans ce modèle : les dégénérescences neurofibrillaires et l'inflammation chronique.

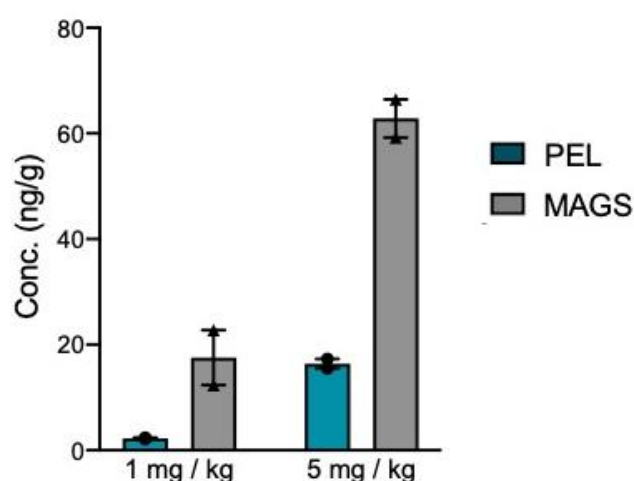


Figure 33 : **Quantification par chromatographie liquide et spectrométrie de masse des molécules PEL et MAGS dans le cerveau des animaux traités.** PEL et MAGS ont été extraits de tissus cérébraux de souris WT traités avec 1 mg/kg ou 5mg/kg et quantifiés par procédure LC - MS/MS TQS. Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM (n = 2 cerveaux et deux mesures répétées pour chaque condition).

Afin de s'assurer de l'innocuité des molécules, une étude pilote a été menée dans laquelle des souris WT ont été traitées durant un mois avec 1 mg/kg ou 5 mg/kg de PEL ou de MAGS. Cette étude pilote a été concluante et aucun effet secondaire n'a été constaté sur les souris. Après le sacrifice de ces souris, leur cerveau a été prélevé afin de vérifier que les molécules passaient la barrière hémato-encéphalique. Florian Descamps et Catherine Piveteau ont réalisé l'extraction des molécules des tissus cérébraux et ont effectué la quantification par chromatographie liquide

et spectrométrie de masse des molécules dans le cerveau des animaux traités. Les molécules sont effectivement présentes dans le cerveau, et la Figure 33 illustre la quantité de chaque molécule retrouvée dans le tissu cérébral des souris. On peut voir que la quantité présente est proportionnelle à la dose de molécule administrée, mais surtout que MAGS s'accumule en plus forte quantité par rapport à PEL qui semble être éliminé plus facilement.

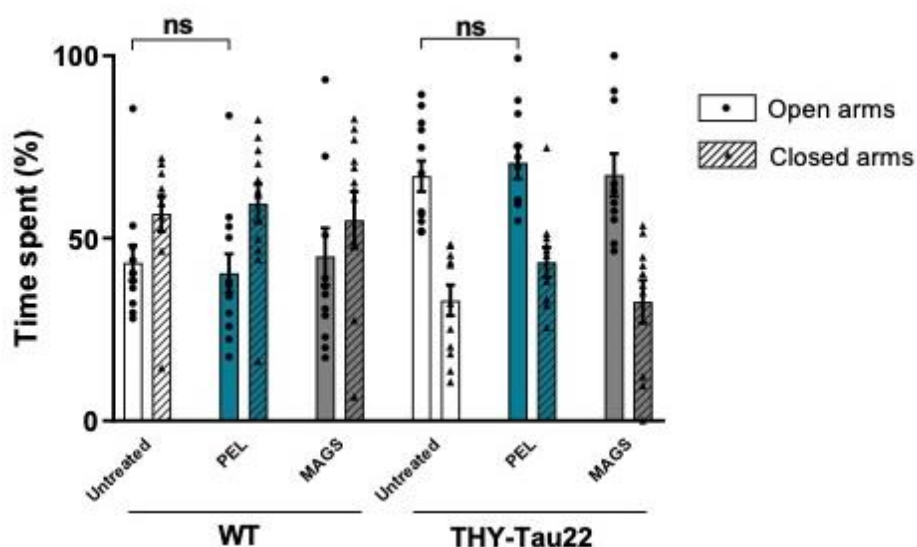


Figure 34 : **Évaluation de l'anxiété des souris THY-Tau22 traitées ou non avec PEL ou MAGS.** Les données du test du Labyrinthe en croix surélevé sont rapportées sur l'histogramme en tant que moyennes $\pm$ SEM ($n = 10$ animaux par condition) du temps passé dans les bras ouverts (points) par rapport aux bras fermés (triangles et barres hachurées). Les souris THY-Tau22 sont moins anxieuses que les souris de type sauvage (WT) mais les traitements PEL ou MAGS n'ont eu aucun effet sur l'anxiété des souris. Les différences entre les moyennes étaient statistiquement non significatives (ns).

L'anxiété des souris, qui peut interférer avec les tests de mémoire, a été évaluée chez les souris THY-Tau22 et de phénotype sauvage (WT). Malgré le fait que les souris THY-Tau22 soient significativement moins anxieuses et aillent davantage dans les bras ouverts que les souris WT, ce qui est un comportement caractéristique du modèle (Van der Jeugd et al., 2013), les traitements PEL et MAGS n'ont montré aucun impact significatif sur le pourcentage de temps passé dans les bras fermés ou les bras ouverts pour les souris WT ou THY-Tau22 (Figure 34, $n=10$ animaux par groupe ; $p=0,53$). Ainsi, les traitements n'ont pas affecté significativement l'anxiété basale des souris WT et THY-Tau22, suggérant que les tests de mémoire après les traitements n'ont pas été influencés par des biais comportementaux.

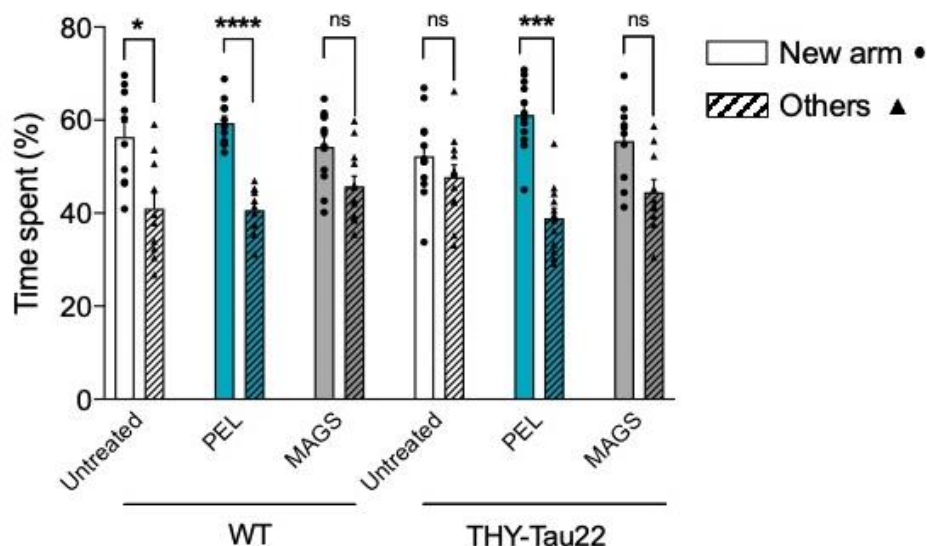


Figure 35 : **PEL restaure la mémoire à court-terme dans le modèle de souris THY-Tau22.** Test de mémoire à court terme du labyrinthe en Y, avec les animaux non traité (non coloré) vs. les THY-Tau22 traitées avec PEL (bleu) et MAGS (gris). Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM (n = 10 animaux par condition) du temps passé dans le nouveau bras (points) par rapport aux deux autres bras (triangles et hachures). La significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, et **** : $p < 0,0001$, ns ; non significatif.

Bien que des enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau soient observés dans l'hippocampe des THY Tau22 à 6 mois, les troubles cognitifs dans ce modèle sont modérés avant cet âge (Carvalho et al., 2019). La pathologie se renforce à 7 mois, stade auquel les souris THY-Tau22 commencent à présenter des troubles de la mémoire spatiale et un développement continu de la pathologie Tau (Sergeant et al., 2019). Les déficits de mémoire spatiale associés s'aggravent ensuite au fil du temps pour atteindre un maximum à 10 mois (Schindowski et al., 2006; Van der Jeugd et al., 2013). Afin de comparer les effets *in vivo* de PEL et de MAGS, un test de mémoire spatiale à court-terme a été effectué à 7 mois, après les 6 semaines de traitement dans un paradigme curatif. Dans le test du labyrinthe en Y, les souris WT de 7 mois traitées à 1 mg/kg avec MAGS ont passé moins de temps dans le nouveau bras que les souris WT non traitées (Figure 35). A la même dose, PEL n'a pas modifié les performances des souris WT. A 7 mois, les souris THY-Tau22 non traitées présentaient des troubles de la mémoire avec une absence de préférence entre le nouveau bras et les autres. Le traitement MAGS n'a eu aucun effet significatif sur la mémoire spatiale des souris THY-Tau22. En revanche, le traitement PEL à 1mg/kg a permis une atténuation significative des troubles de la mémoire des souris THY-Tau22.

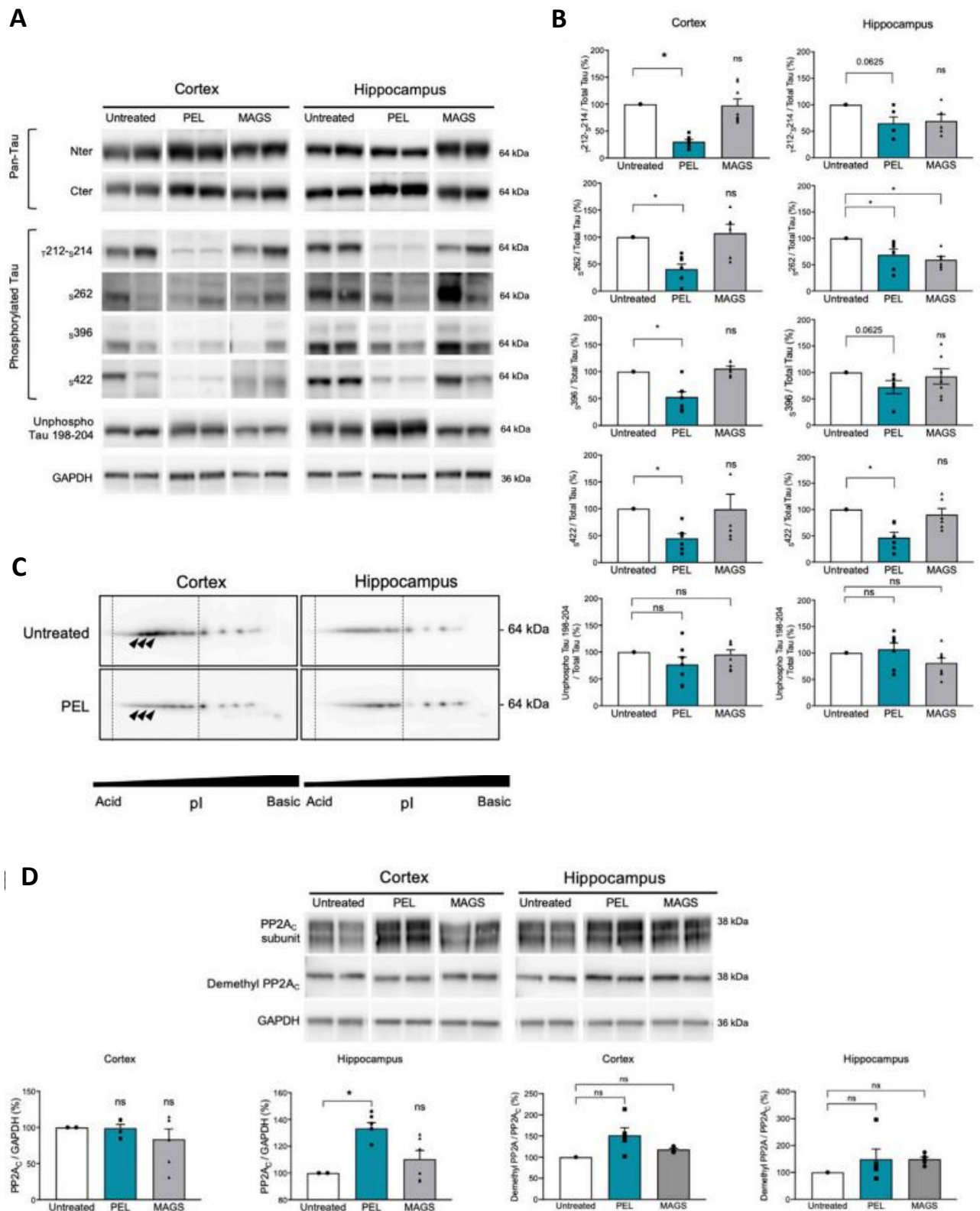


Figure 36 : PEL diminue la phosphorylation pathologique et l'hyperphosphorylation de Tau et augmente également la synthèse de PP2A_C. (A) Western blot de la synthèse de Tau dans le cortex et l'hippocampe de souris THY-Tau22 traitées ou non avec PEL ou MAGS en utilisant deux anticorps anti pan-Tau N-terminal (Nter) et C-terminal (Cter), et anti Tau phosphorylée au niveau de la thréonine 212 et de la sérine 214 (T212-S214), de la sérine 262 (S262), de la sérine 396 (S396), de la sérine 422 (S422), et des résidus Tau non phosphorylés compris dans la séquence Tau 198-204 (unphospho Tau 198-204).

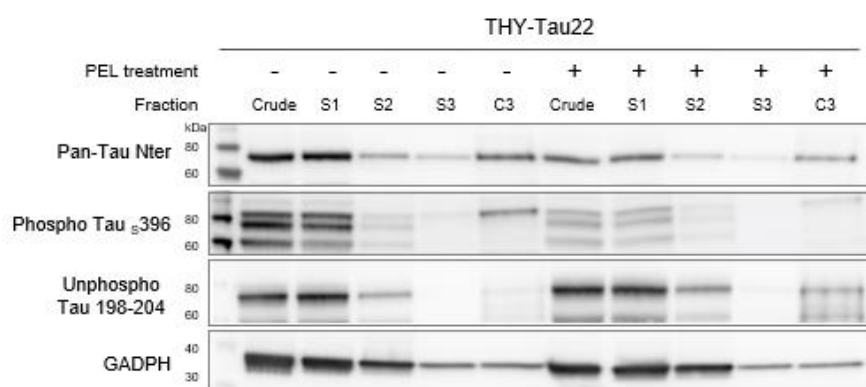
(B) Quantification de la synthèse de Tau par Western Blot. Les conditions non traitées ont reçu la valeur de 100 %. Les moyennes $\pm$ SEM sont représentées. La significativité au test de Mann-Whitney est indiquée * : $p < 0,05$. (C) Électrophorèse sur gel bidimensionnelle et Western blot des isovariants de la Tau totale humaine dans le cortex ou l'hippocampe provenant d'animaux non traités, traités par PEL ou MAGS. L'orientation acido-basique (pI) des Western blots 2D est indiquée sur l'axe des x, et le poids moléculaire apparent de la protéine Tau de 64 kDa est indiqué sur l'axe des y. Les lignes pointillées verticales englobent l'isovariant tau le plus acide, et les différences sont indiquées par des pointes de flèches. Les isovariants Tau s'étendent vers des points isoélectriques plus acides dans les extraits de cerveau hippocampique THY-Tau22 d'animaux non traités. L'électrophorèse bidimensionnelle est représentative d'un pool de cinq animaux par condition. (D) Western blots de la sous-unité catalytique C de PP2A (PP2A_C), de la déméthyl PP2A_C et de la GAPDH, et représentations d'histogramme de l'analyse semi-quantitative de la synthèse la sous-unité catalytique de la phosphatase PP2A_C dans le cortex et l'hippocampe des souris non traitées (valeur de 100 %) et des animaux THY-Tau22 traités avec PEL ou MAGS. Les histogrammes du rapport du déméthyl PP2A_C sur la production totale de PP2A_C sont exprimés en pourcentage de la condition non traitée qui a reçu la valeur de 100 %.

Les troubles cognitifs sont associés à une progression de la pathologie Tau dans l'hippocampe et le cortex des souris THY-Tau22 (Van der Jeugd et al., 2013). Ainsi, les troubles de la mémoire pourraient être liés à une modification de la pathologie Tau et l'état de phosphorylation de la protéine Tau. Nous avons évalué la synthèse hippocampique et corticale de Tau ainsi que les niveaux de phosphorylation de Tau à l'aide d'anticorps dirigés contre les extrémités N- et C-terminale de Tau, et contre les phospho-sites spécifiques connus pour être hyperphosphorylés dans la MA (Augustinack et al., 2002), ainsi que contre les épitopes qui ne sont détectés que lorsque des processus neurofibrillaires sont présents ($\tau_{212/s214}$ et $s422$). Le traitement avec PEL ou MAGS n'a pas changé la production globale de la protéine Tau totale que ce soit dans le cortex ou dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 (Figure 36A). La phosphorylation de Tau sur les épitopes physiologiques ou pathologiques après le traitement MAGS n'était pas significativement diminuée, à l'exception de la phosphorylation sur la sérine 262 (Figure 36B). De manière notable, PEL a diminué le niveau de Tau phosphorylée sur la $s396$ et la $s262$ et a diminué les épitopes pathologiques $\tau_{212/s214}$ et $s422$ dans le cortex de moitié. De plus, PEL a considérablement réduit la phosphorylation de Tau aux sites $s262$, $s396$ et $s422$, et les phospho-sites $\tau_{212/s214}$; cependant, ce n'était pas statistiquement significatif ($p=0,0625$) dans l'hippocampe des souris THY Tau22 traitées (Figure 36B). Les traitements PEL ou MAGS n'ont pas modifié les niveaux de Tau non-phosphorylée sur les acides aminés 198-204. Le statut global de phosphorylation a ensuite été analysé par électrophorèse sur gel bidimensionnelle et marquage de la Tau totale avec l'anticorps pan-Tau Cter. Les isovariants phosphorylés migrent vers les points isoélectriques plus acides des gels 2D. Une réduction de ces isovariants acides a été observée dans le cortex et l'hippocampe de souris THY-Tau22 traitées avec PEL et MAGS par rapport aux souris THY Tau22 non traitées (Figure 36C), les isovariants comprenaient les

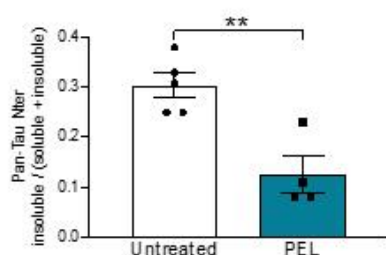
lignes pointillées et étaient indiqués par des pointes de flèche). La phosphorylation de Tau est contrôlée par les phosphatases et les kinases, la production de la principale sérine/thréonine phosphatase de Tau, PP2A (Liu et al., 2005) a donc été investiguée. Avec le traitement MAGS et PEL la synthèse de la sous-unité catalytique PP2A_C est restée inchangée dans le cortex (Figure 36D). Cependant, PEL a fortement augmenté la synthèse de PP2A_C dans l'hippocampe des souris THY-Tau22.

La méthylation ou la déméthylation de la sous-unité catalytique de PP2A_C sur la leucine 309 reflète son activité phosphatase, où PP2Ac méthylée correspond à la forme activée de la phosphatase (Papon et al., 2013; Sontag and Sontag, 2014; Ahmed et al., 2020). Le rapport de PP2A_C déméthylé sur PP2A_C n'a montré aucune modification significative entre les animaux non traités et traités, suggérant une activité inchangée (Figure 36D).

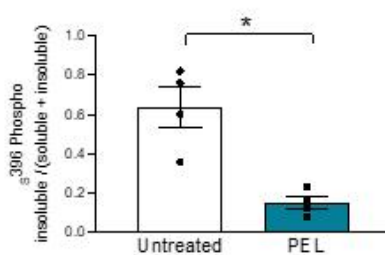
A



B



C



D

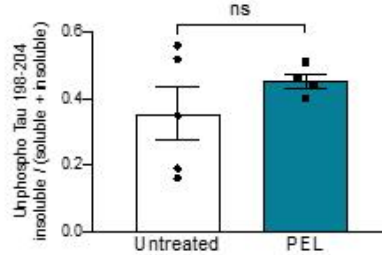


Figure 37 : Le traitement avec PEL diminue la fraction de Tau phosphorylée insoluble chez les souris THY-Tau22. (A) Western blot des protéines Tau (Pan-Tau Nter), des protéines Tau phosphorylées sur la sérine 396 (Phospho-Tau s396) et des protéines Tau non-phosphorylées (Unphospho Tau 198-204) dans les culots bruts (Crude), S1 à S3 et C3 insolubles provenant de l'hippocampe de souris THY-Tau22 non traitées (-) ou traitées au PEL (+). La GAPDH a été réalisée afin de s'assurer qu'une quantité égale de matériel a été chargée entre les fractions de protéines non traitées et traitées. (B, C, D) Histogrammes représentant le rapport moyen entre le signal de la fraction insoluble (C3) divisé par le signal de la fraction soluble (S1) plus insoluble pour Pan-Tau Nter, phospho

Tau s396 et Tau non phosphorylée 198-04 dans les fractions hippocampiques des THY-Tau22 traitées ou non avec PEL (n=5 pour la condition non-traitée et n=4 pour la condition PEL).

Les dégénérescences neurofibrillaires sont caractérisées par une agrégation de protéines Tau d'hyper- et anormalement phosphorylées. Cette agrégation est associée à une insolubilité accrue de Tau (Schindowski et al., 2006). La solubilité de Tau a été étudiée plus en détail en investigant les fractions Tau insolubles (Sergeant et al., 2003) des souris THY-Tau22 traitées avec MAGS ou PEL. La Tau totale et la Tau phosphorylée à la sérine 396 ont été réduites dans la fraction insoluble (C3) du tissu cérébral des souris traitées avec PEL (Figures 37). La Tau non phosphorylée est restée inchangée dans cette même fraction insoluble (C3). Le traitement avec MAGS n'a pas modifié la distribution de la Tau totale ou phosphorylée sur la sérine 396 que ce soit dans les fractions protéiques solubles ou insolubles (Figure 38). Par conséquent, alors que MAGS à 1 mg/mL n'a pas affecté l'insolubilité de la protéine Tau, PEL a permis de diminuer l'insolubilité de Tau dans les THY-Tau22 traitées.

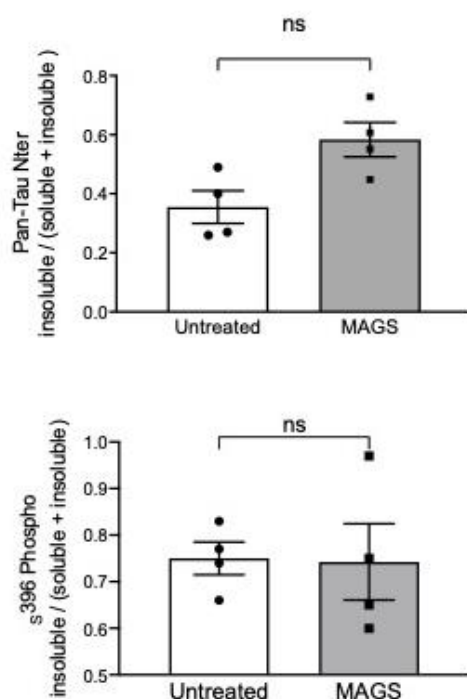


Figure 38 : **Analyse de l'insolubilité de Tau dans le cerveau des souris THY-Tau22 traitées avec MAGS.** Représentations en histogrammes du rapport moyen $\pm$ SEM entre le signal de la fraction insoluble (C3) divisé par le signal dans la fraction soluble (S1) plus insoluble pour le marquage Pan-Tau Nter et Phospho-Tau s396 dans les fractions hippocampiques des souris THY-Tau22 traitées ou non avec MAG (n = 5 pour les animaux non traités et n = 4 pour les animaux traités avec MAGS). Les différences moyennes étaient statistiquement non significatives (ns).

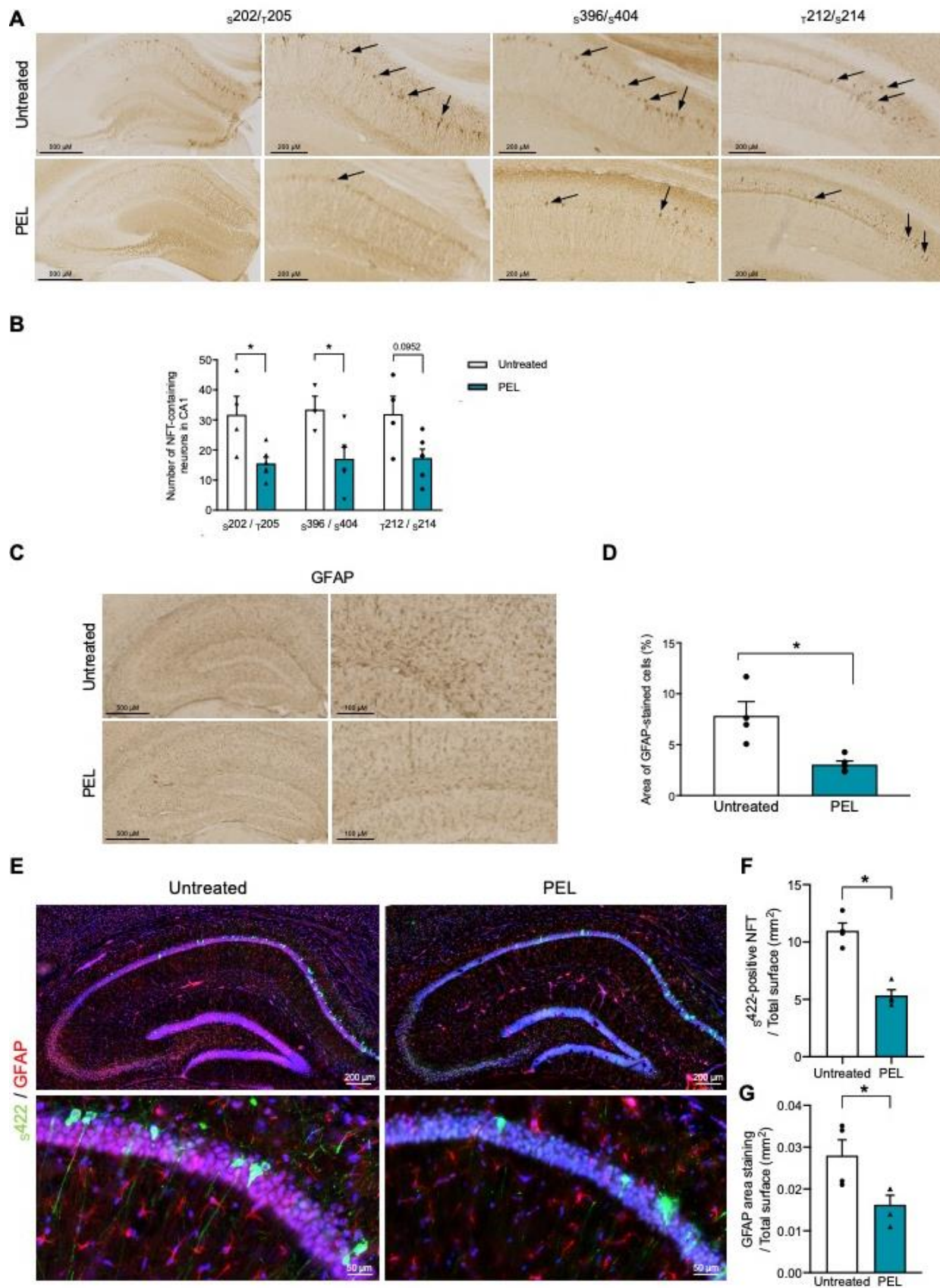


Figure 39 : La pathologie Tau et l'astrogliose sont réduites chez les souris THY-Tau22 traitées avec PEL. (A) Immunohistochimie avec des anticorps phospho-Tau dirigés contre les phospho-épitoques

s202/τ205 et s396/s404 ou les épitopes pathologiques (τ212/s214) dans l'hippocampe des animaux THY-Tau22 traités ou non avec PEL. (B) Le nombre moyen de neurones marqués sur les épitopes s202/τ205, s396/s404 et τ212/s214 contenant de la DNF (dégénérescence neurofibrillaire) observés dans la zone CA1 de l'hippocampe des animaux THY-Tau22 traités ou non avec PEL ont été dénombrés et sont représentés sur l'histogramme. (C) Les astrocytes réactifs ont été marqués avec un anticorps anti-GFAP dans les sections de l'hippocampe des souris THY-Tau22 non traitées et traitées avec PEL. (D) Représentation sous forme d'histogramme du rapport du marquage GFAP sur la surface totale de l'hippocampe en pourcentage. (E) Analyse par immunofluorescence de la DNF et de l'astrogliose dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 traitées ou non avec PEL. L'anticorps s422 a été utilisé pour la détection des DNF (en vert) et l'anticorps GFAP a été utilisé pour marquer les astrocytes réactifs (en rouge). Ainsi, les marquages s422 et GFAP étaient significativement réduits dans les souris THY-Tau22 traitées avec PEL. (F) Rapport du nombre de DNF positifs pour l'épitope s422 sur la surface totale en mm² dans la CA1 de l'hippocampe des THY-Tau22 non traitées ou traitées avec PEL. (G) Rapport du marquage GFAP sur la surface totale en mm² dans la CA1 hippocampique des souris THY-Tau22 traitées ou non avec PEL. Les différences statistiques entre les conditions non traitées et traitées ont été considérées significatives avec une valeur p inférieure à 0,05 (*). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de trois sections hippocampiques individuelles par animal et un minimum de quatre animaux par condition.

Les souris THY-Tau22 présentent des enchevêtrements neurofibrillaires ainsi qu'une astrogliose modérée (Schindowski et al., 2006). Afin d'évaluer plus en détail l'effet modulateur de nos composés, la quantité de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans la zone CA1 de l'hippocampe a été étudiée par immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre les épitopes de Tau hyperphosphorylée s202/τ205 et s396/s404 et les phospho-sites de Tau pathologiques τ212/s214. Le traitement avec MAGS a entraîné une légère, mais non-significative, réduction du nombre de DNF (Figure 40 A, B). Chez les animaux THY-Tau22 traités avec PEL, les neurones contenant de la DNF positifs pour les épitopes s202/τ205 et s396/s404 ont été significativement réduits (Figure 39 A, B). Le nombre de DNF marquée avec l'anticorps anti phospho-Tau pathologique τ212/s214 a été réduit également, mais pas de manière significative (p=0,0952). De manière intéressante, une réduction significative de la DNF marquée par l'anticorps phospho-Tau s422 a été observée par immunofluorescence, démontrant en outre que le traitement avec PEL permet de réduire la pathologie Tau (Figure 39 E, F). En revanche MAGS n'a pas eu d'effet sur le nombre de neurones contenant de la DNF positifs pour l'épitope s422 en immunofluorescence (Figure 40 C, D). L'activation astrogliale est déclenchée parallèlement au développement de la pathologie Tau (Schindowski et al., 2006; Laurent et al., 2017, 2018) et favorise vraisemblablement son développement (Laurent et al., 2018; Ising et al., 2019). L'influence de PEL et MAGS sur l'activation des astrocytes a donc été étudié plus en détail, à la fois par immunohistochimie et immunofluorescence. Le traitement avec MAGS n'a pas modifié le nombre d'astrocytes positifs pour la GFAP (Figure 40 C, E). En revanche, les souris THY-Tau22 traitées avec PEL ont montré une réduction significative des

astrocytes GFAP-positifs à la fois par immunohistochimie et immunofluorescence (Figure 39 D, G). Cette diminution du marquage GFAP a été associée à une modification limitée de la synthèse de la connexine43, une protéine de jonction majeure des astrocytes (Figure 41).

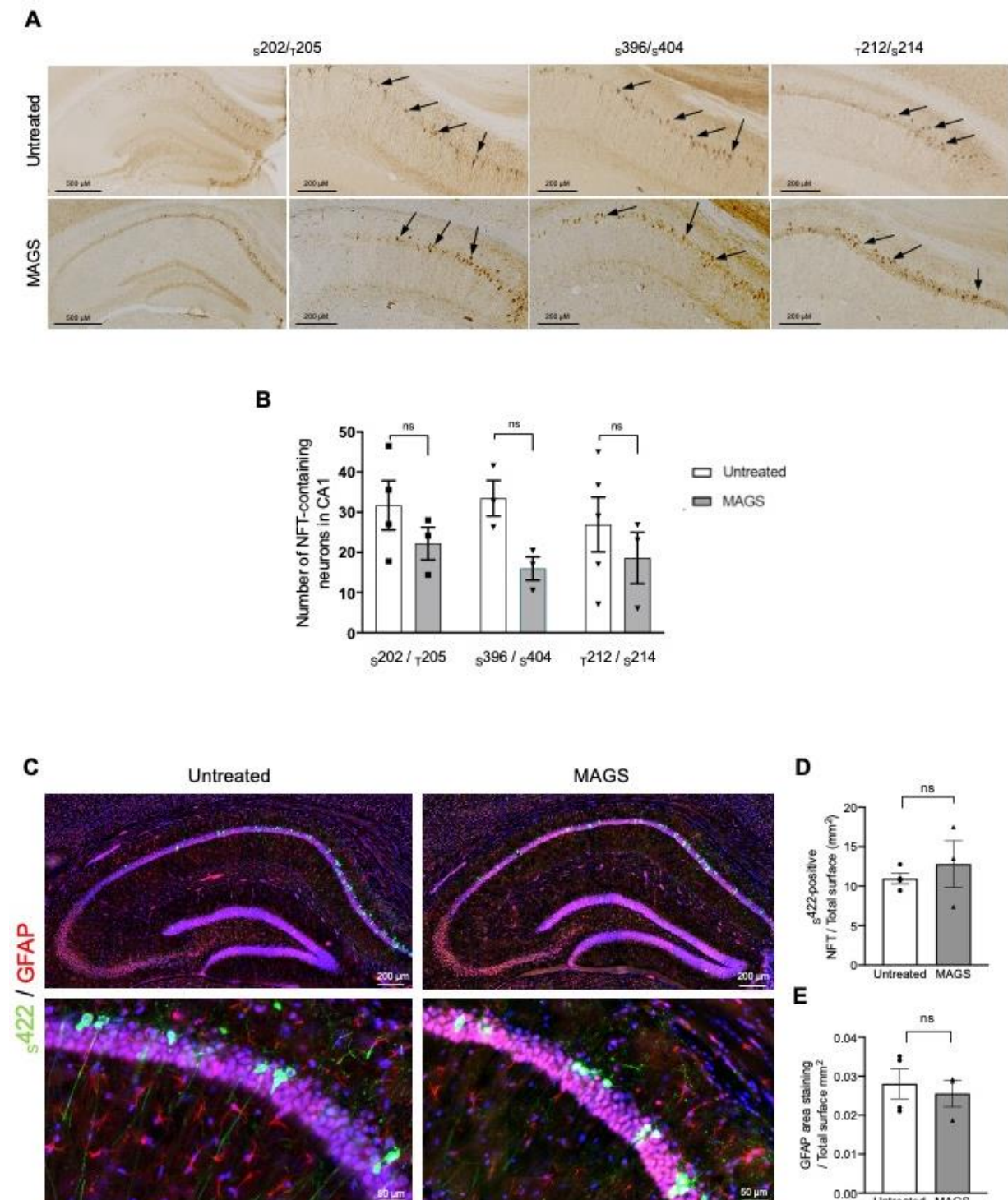


Figure 40 : La pathologie Tau et l'astrogliose demeurent inchangées dans les animaux THY-Tau22 traités avec MAGS. (A) Immunohistochimie avec les anticorps phospho-Tau dirigés contre les phospho-épitopes s202/τ205 et s396/s404 ou épitopes pathologiques (τ212/s214) dans l'hippocampe d'animaux THY-Tau22 traités ou non avec MAGS. (B) Le nombre moyen de neurones marqués

contenant de la DNF observés dans la CA1 de l'hippocampe sont représentés sur l'histogramme. Les neurones marqués avec les s_{202}/T_{205} , s_{396}/s_{404} et T_{212}/s_{214} ont été dénombrés dans l'hippocampe d'animaux non traités et traités avec MAGS. Les différences statistiques étaient non significatives (ns). (C) Analyse par immunofluorescence des DNF et de l'astroglie dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 traitées ou non avec MAGS. L'anticorps s_{422} a été utilisé pour la détection de la DNF (en vert) et l'anticorps GFAP a été utilisé pour marquer les astrocytes réactifs (en rouge). (D) Rapport du nombre de DNF positives à l'anticorps s_{422} sur la surface totale en mm^2 de la CA1 de l'hippocampe d'animaux THY-Tau22 non traités ou traités avec MAGS. (E) Rapport du marquage GFAP sur la surface totale en mm^2 de la zone CA1 hippocampique des souris THY-Tau22 traitées ou non avec MAGS. Les statistiques étaient non significatives (ns). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM à partir de 3 tranches de cerveau par animal et pour 4 animaux par condition.

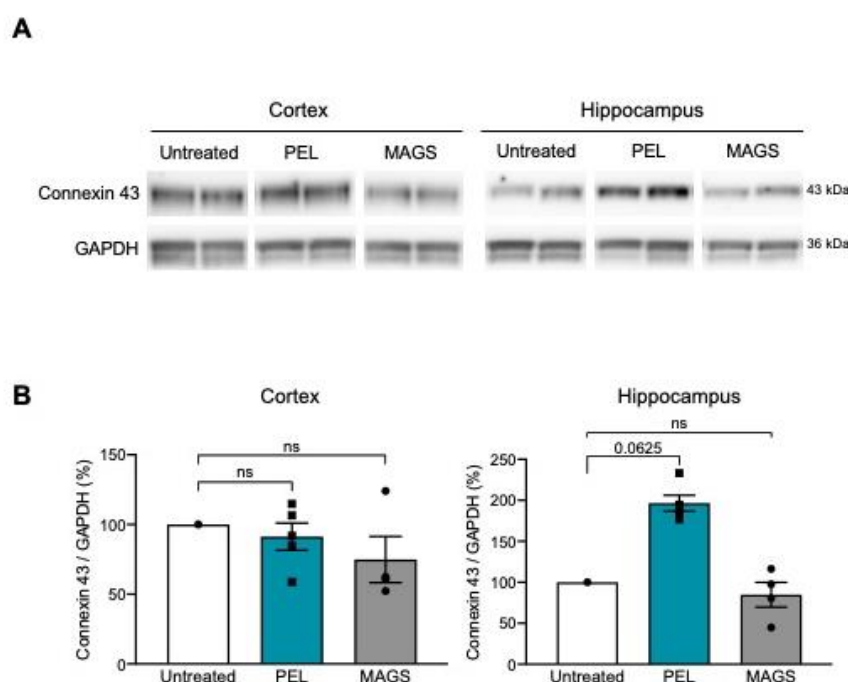


Figure 41 : **PEL et MAGS n'ont pas modifié les niveaux de synthèse de connexine43 dans les animaux THY-Tau22.** (A) Western blot de lysats cérébraux de souris THY-Tau22 ou de souris THY-Tau22 traitées avec 1 mg/kg de PEL ou MAGS utilisés pour évaluer les niveaux de production de la protéine Connexin43. (B) Quantification Western-blot de la synthèse de la Connexin43 dans l'hippocampe et le cortex, exprimée en pourcentage de la condition contrôle. Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM ($n = 5$ souris pour chaque condition).

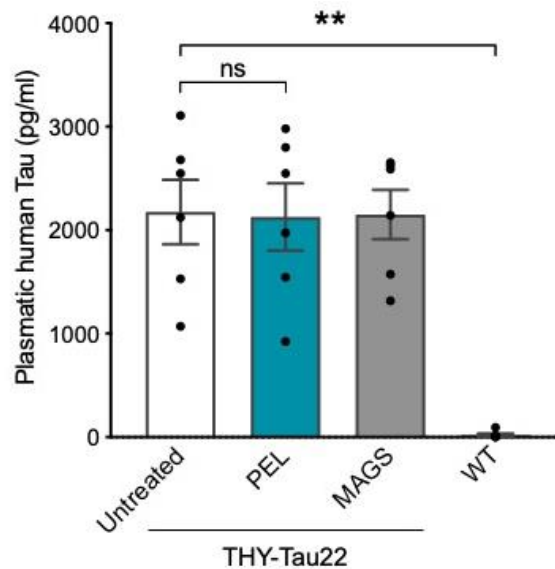


Figure 42 : **Mesures ELISA quantitatives de la concentration plasmatique de Tau dans les souris THY-Tau22 WT, non traitées, traitées avec MAGS ou traitées avec PEL.** Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM pour chaque condition (n = 7 animaux par condition). Le test statistique de Mann-Whitney a été considéré comme significatif lorsque $p < 0,01$ (*), ns : non significatif.

La quantité de Tau dans le plasma des souris THY-Tau22 a ensuite été investiguée afin de savoir si le traitement PEL ou MAGS pouvait augmenter la clairance plasmatique de Tau (Figure 42). MAGS n'a pas modifié le niveau basal de Tau dans le plasma des souris THY-Tau22, et la baisse de la phosphorylation de Tau suite au traitement avec PEL n'a pas été suivie d'une augmentation de la clairance plasmatique de Tau, suggérant que les effets positifs observés avec le traitement PEL sur la diminution de la pathologie Tau ne sont pas liés à une modification de la clairance plasmatique de la protéine Tau.

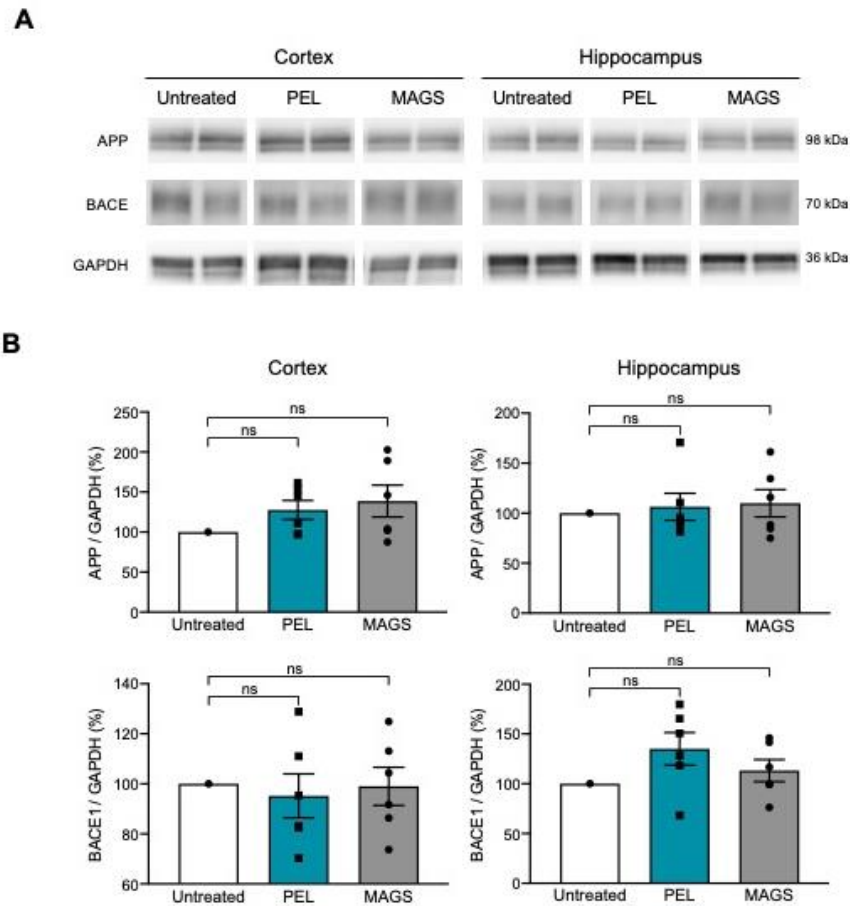


Figure 43 : **PEL et MAGS n'ont pas modifié les niveaux de synthèse d'APP et de BACE1.** (A) Les lysats cérébraux de souris THY-Tau22 non traitées ou de souris THY-Tau22 traitées avec 1 mg/kg de PEL ou MAGS ont été résolus par électrophorèse sur gels puis marqués avec les anticorps APP et BACE1. (B) La semi-quantification des niveaux de synthèse d'APP et BACE1 est représentée sous forme de pourcentage de la condition non traitée pour les échantillons du cortex ou de l'hippocampe de souris traitées avec PEL ou MAGS. (n=5 souris pour chaque condition).

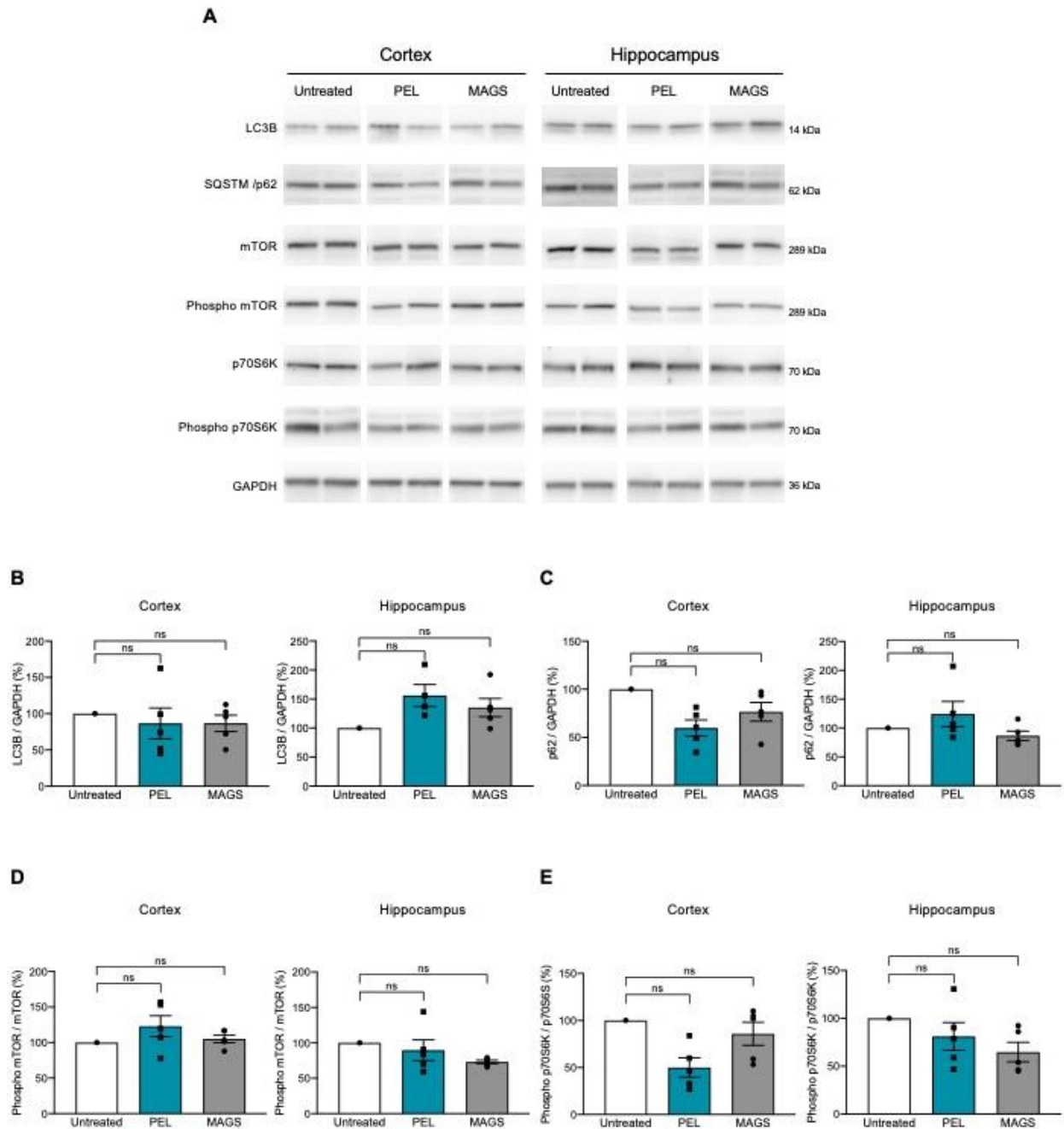


Figure 44 : PEL et MAGS n'ont pas modifié les niveaux de synthèse des marqueurs de l'autophagie
 .(A) Les western blots de lysats cérébraux de souris THY-Tau22 ou de souris THY-Tau22 traitées avec 1 mg/kg de PEL ou MAGS ont été incubés avec les anticorps ciblant LC3B, p62, mTOR, phospho mTOR, p70S6K et phospho p70S6K. (B-E) Semi-quantification sous forme d'histogramme des niveaux de synthèse de LC3B (B), p62 (C), du ratio phospho mTOR / mTOR (D) et du ratio phospho p70S6K / p70S6K (E) dans le cortex et l'hippocampe de souris THY-Tau22 non traitées et traitées avec PEL ou MAGS, exprimé en pourcentage de la condition contrôle (n = 5 souris par condition). Les tests statistiques non significatifs sont indiqués (ns).

In vitro, MAGS contrairement à PEL, a conduit à l'augmentation de la synthèse des marqueurs d'autophagie tels que p62 ou LC3, tandis que les deux molécules sont des inhibiteurs non compétitifs de la β -secrétase. La production de l'APP et de BACE1 ainsi que plusieurs marqueurs de l'autophagie a ainsi été analysée, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des molécules *in vivo*. La synthèse de l'APP et de BACE1 n'a pas été modifiée par les traitements avec PEL ou MAGS (Figure 43). La synthèse de LC3 ou de p62 est resté inchangée dans les conditions de traitement par rapport aux souris THY-Tau22 non traitées (Figure 44). De plus, mTOR et la synthèse de sa kinase cible en aval p70S6 ainsi que sa phosphorylation (p70S6K) n'ont pas été modifiées non plus par les traitements avec MAGS ou PEL dans les souris THY-Tau22. Ces résultats suggèrent que l'autophagie ne fait pas partie de la cascade de signalisation modulée par nos molécules.

Dans cette étude, nous avons montré qu'un traitement curatif avec PEL à 1 mg/kg, contrairement à un traitement avec MAGS à la même dose, conduit à une restauration des fonctions cognitives, à une réduction de la pathologie Tau et à une diminution de l'astroglie dans le modèle transgénique de pathologie Tau hippocampique THY-Tau22. L'activité lysosomotropique semble donc dispensable et l'effet de notre molécule reposerait sur une modification du traitement de l'APP via un effet de modulation de la β -secrétase.

II. Etude de l'activité de PEL sur le modèle APP/PS1

Le but de cette deuxième étude était de mettre en évidence si PEL, qui est capable d'influencer le métabolisme de l'APP *in vitro* en le redirigeant vers la voie non-amyloïdogénique, pouvait également être efficace sur la pathologie amyloïde *in vivo* dans le modèle APP/PS1, et également d'investiguer par quels mécanismes d'action PEL serait susceptible d'agir.

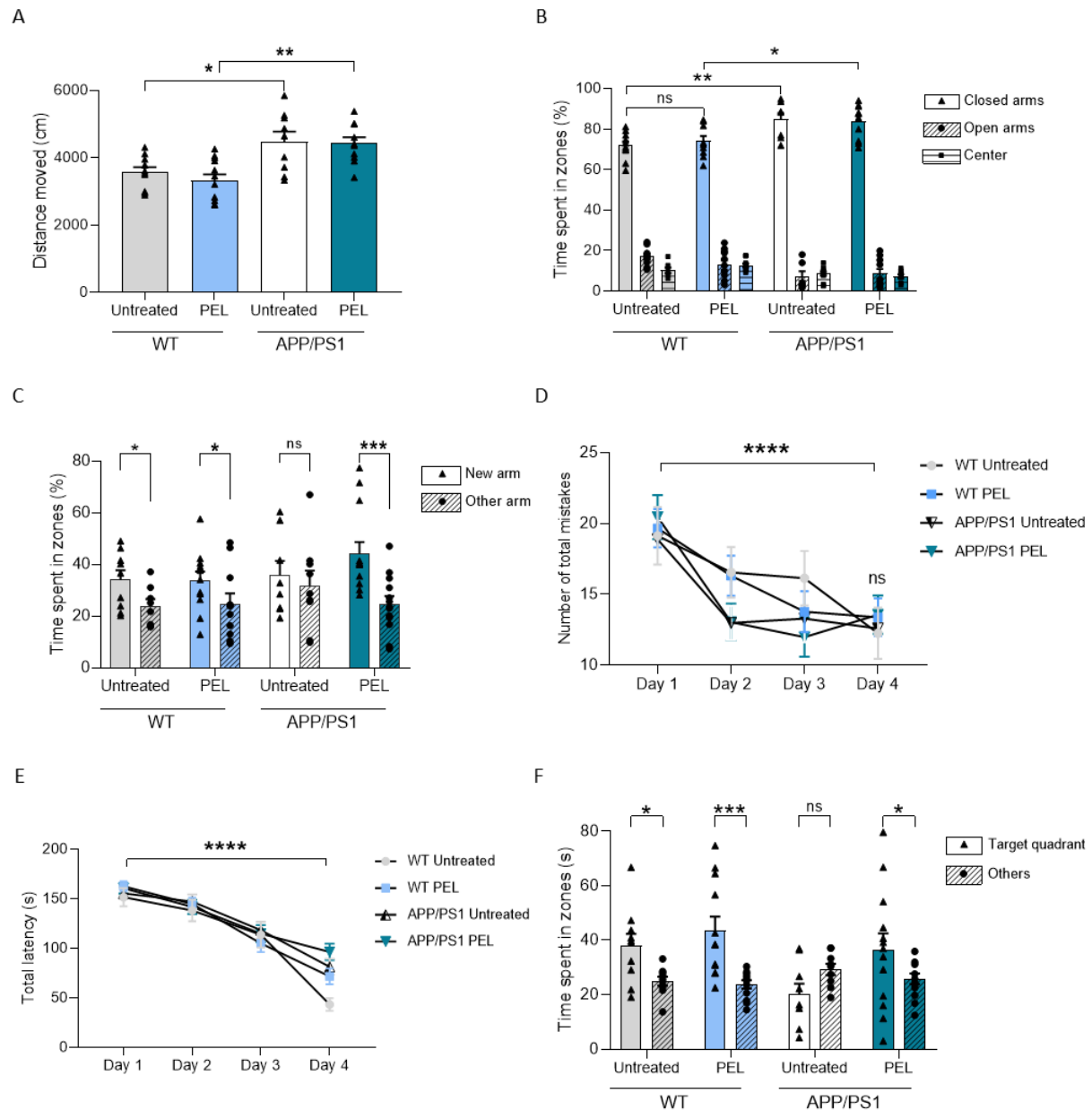


Figure 45 : **PEL restaure la mémoire à court-terme et long-terme des souris APP/PS1.** A. Test de locomotion et de motricité des animaux WT et APP/PS1 non-traités versus traités avec PEL. Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM de la distance parcourue pendant 10 min par les animaux. B. Test d'anxiété des animaux WT et APP/PS1 non-traités versus traités avec PEL. Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM du temps passé dans les bras ouverts (triangle) par

rapport aux bras fermés (points et barres hachurées). C. Test de mémoire à court-terme des animaux WT et APP/PS1 non-traités versus traités avec PEL. Les histogrammes représentent les moyennes $\pm$ SEM du temps passé dans le Nouveau bras (triangle) par rapport à l'autre bras (points et barres hachurées). D, E. Phase d'apprentissage du test de mémoire à long-terme entre le jour 1 et le jour 4 des animaux WT et APP/PS1 non-traités versus traités avec PEL, sont représentées la latence totale et le nombre total d'erreurs nécessaires aux souris pour trouver le trou cible. F. La mémoire spatiale a été évaluée 72 h après le dernier jour de la phase d'apprentissage. Les résultats représentent le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible par rapport aux quadrants non-cibles (autres). Les souris WT (traitées avec de l'eau ou PEL) ont passé davantage de temps dans le quadrant cible, indiquant une mémoire spatiale préservée, alors que les souris APP/PS1 présentaient des déficits nets de mémoire spatiale, comme le souligne leur absence de préférence pour le quadrant cible. Les souris APP/PS1 traitées avec PEL se sont comportées de manière similaire aux souris WT, suggérant que le traitement a permis de supprimer les troubles de la mémoire à long-terme. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$, ns : non significatif en utilisant le test Two-Way ANOVA; N = 8-12 par groupe.

Dans la présente conception expérimentale, des souris APP/PS1, un modèle d'amyloidogénèse, et des souris WT ont été traitées avec 1 mg/kg de PEL, en utilisant un paradigme curatif décrit précédemment comme améliorant la pathologie dans un modèle murin de pathologie Tau hippocampique (Tautou et al., 2021). Les souris ont été traitées de 8 à 12 mois, après l'apparition de la pathologie amyloïde et des déficits cognitifs associés dans ce modèle transgénique (Jankowsky et al., 2001). Après 3 mois de traitement, la motricité et l'anxiété des souris APP/PS1 ont été évaluées grâce à un actimètre infrarouge et le test du Labyrinthe en croix surélevé. Comme le montre la Figure 45A, les souris APP/PS1 étaient plus actives que les souris WT, mais PEL n'a eu aucun impact sur la distance parcourue ($p > 0,05$). En ce qui concerne le test d'anxiété, les souris APP/PS1 étaient moins anxieuses que les souris WT, cependant aucun impact significatif de PEL sur le temps passé dans les bras ouverts vs les bras fermés n'a été constaté (Figure 45B ; $p > 0,05$), suggérant que le traitement n'a eu aucun impact sur l'anxiété chez les souris WT et APP/PS1. Nous avons ensuite évalué l'impact de PEL sur la mémoire spatiale à court et à long terme en utilisant respectivement le labyrinthe en Y (Y-Maze) et le test de Barnes. Dans le test du Y-Maze, les groupes WT traités et non-traités ont passé davantage de temps dans le bras 'Nouveau', leur mémoire à court-terme n'est donc pas altérée (Figure 45C). Le groupe APP/PS1 non-traité a passé le même temps dans le bras 'Nouveau' que dans les autres bras sans distinction de préférence, ce qui souligne l'altération mnésique dans ce modèle. De manière intéressante, les souris APP/PS1 traitées avec PEL ont passé significativement plus de temps dans le bras 'Nouveau' que dans les autres bras ($p < 0,001$), montrant que le traitement PEL a permis de restaurer la mémoire à court-terme des souris APP/PS1. En ce qui concerne le test de Barnes, pendant la phase d'entraînement, tous les groupes ont présenté une diminution du nombre total d'erreurs et de la latence totale à trouver le trou cible au fur et à mesure des essais (Figure 45D et E ; $p < 0,0001$, ANOVA

bidirectionnelle). Soixante-douze heures après la phase d'entraînement, le test a été effectué afin d'évaluer la mémoire spatiale à long-terme des souris APP/PS1. Quel que soit le traitement (PEL ou eau), les souris WT ont montré une nette préférence pour le quadrant cible par rapport aux autres zones (Figure 45F ; WT non traité : $p < 0,05$; WT PEL24-199 : $p < 0,0005$). En revanche, les souris non traitées APP/PS1 n'ont montré aucune préférence pour le quadrant cible et présentaient des déficits de mémoire spatiale à long-terme, comme attendu dans ce modèle à l'âge de 12 mois ($p > 0,05$). De manière notable, le traitement avec PEL a considérablement atténué les troubles de mémoire spatiale à long-terme chez les souris APP/PS1, comme le démontre le temps significatif passé dans le quadrant cible par rapport aux autres quadrants des souris APP/PS1 traitées avec PEL ($p < 0,05$). Ensemble, ces résultats indiquent qu'un traitement curatif de 4 mois avec PEL a permis de restaurer la mémoire à court et à long-terme dans un modèle transgénique d'amyloïdopathie.

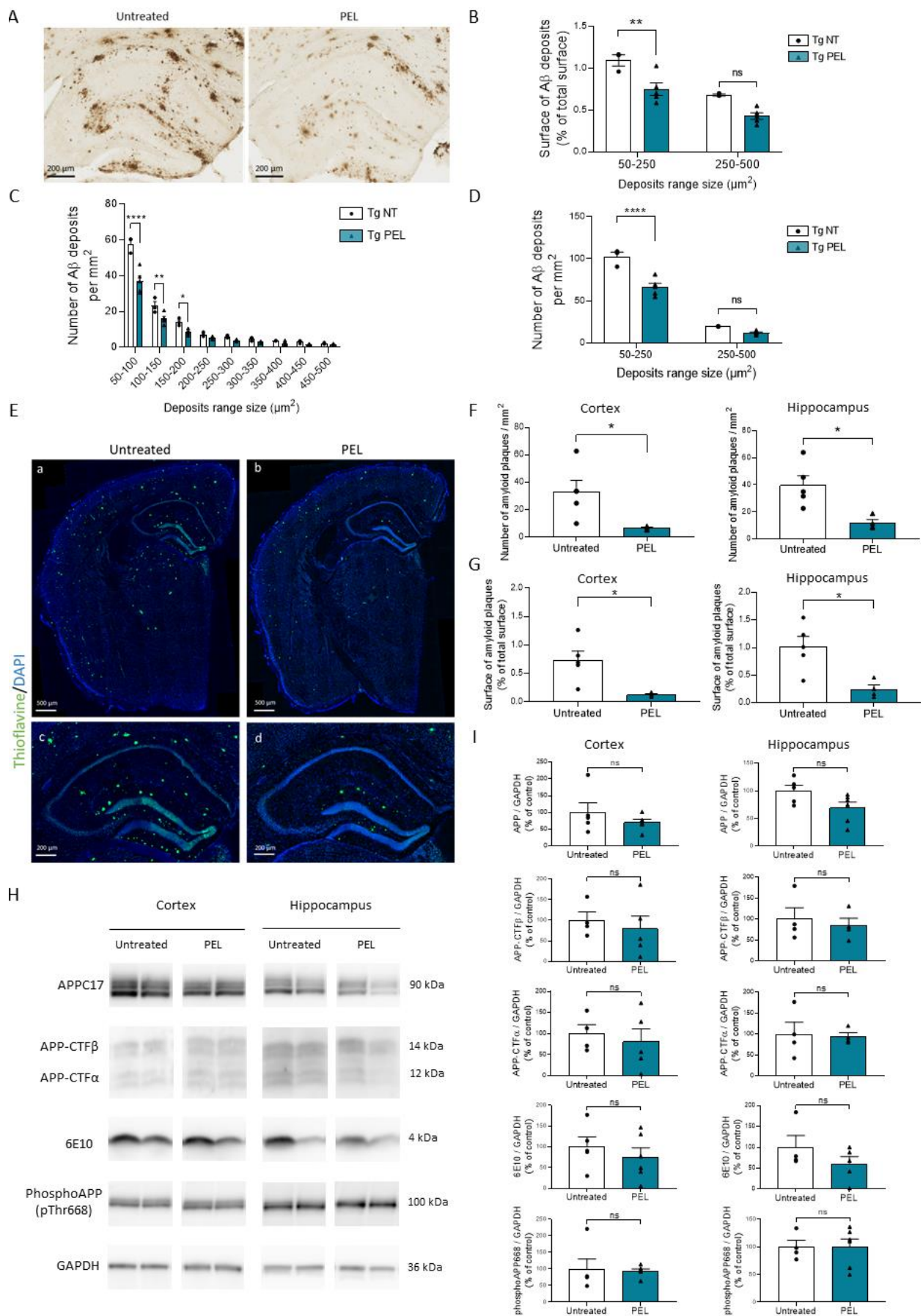


Figure 46 : PEL réduit l'agrégation du peptide A β dans le modèle APP/PS1. A. Images représentatives de la coloration 4G8 dans l'hippocampe des souris APP/PS1 de 12 mois traitées avec de l'eau ou PEL. Barre d'échelle = 200 μ m. La distribution des dépôts A β (B), leur taille et leur nombre (C,D) ont été examinés dans l'hippocampe et dans le cortex des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. Le traitement PEL a réduit significativement à la fois dans le cortex et l'hippocampe la surface convertie par les dépôts A β (B) et la densité des plaques de taille inférieure (entre 50-250 μ m²) par rapport aux animaux APP/PS1 non-traités (50 –250 μ m², $p < 0,0001$ en utilisant l'ANOVA à deux facteurs ; N = 4-5 par groupe)(C,D). E. Images représentatives de la coloration Thioflavine-S (vert) et DAPI (bleu) dans l'hippocampe des souris APP/PS1 de 12 mois traitées avec de l'eau ou PEL. Panneaux supérieurs : barre d'échelle = 500 μ m ; Panneaux inférieurs : barre d'échelle = 200 μ m. Le nombre (F) et la surface (G) couverte par les plaques positives à la Thioflavine-S par mm² ont été étudiés dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. Tant dans le cortex que dans l'hippocampe, la surface et le nombre de plaques amyloïdes ont été significativement diminués. La significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par * : $p < 0,05$. H, I. Analyse par western blot réalisée dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. L'analyse n'a révélé aucun changement dans la synthèse de l'APP totale, des fragments carboxy-terminaux (CTF), du peptide A β et de l'APP phosphorylée sur la Thr668 (N = 5-6 par groupe).

Dans ce modèle, le dépôt d'A β commence à 4 mois dans le cortex et à 6 mois dans l'hippocampe. Les dépôts amyloïdes augmentent en taille et en nombre avec l'âge avec un maximum atteint vers 12 mois (Garcia-Alloza et al., 2006). Pour étudier l'accumulation de peptides A β dans les animaux traités et non traités, un marquage immunohistologique anti-A β a été effectué avec l'anticorps 4G8, qui détecte en plus des plaques A β également des dépôts de peptides A β moins condensés (y compris des fibrilles) (Figure 46A). Après le traitement avec PEL, une forte réduction du pourcentage de surface couverte par les dépôts A β dans l'hippocampe a été observée par rapport aux souris APP/PS1 non traitées ($F(1, 12) = 23,02$, $p = 0,0004$) (Figure 46B). De manière intéressante, si l'on examine en détail la réduction de ces structures 4G8-positives, l'analyse ANOVA a montré que PEL réduisait les plaques A β de petite taille, inférieures à 250 μ m² ($F(1, 12) = 32,20$, $p = 0,0001$), alors que les plaques A β plus grandes entre 250 et 500 μ m² n'ont pas été affectées par le traitement ($p = 0,3601$) (Figure 46 C, D). Afin d'investiguer le nombre et la taille des plaques amyloïdes à noyau dense dans l'hippocampe et le cortex des souris APP/PS1 traitées avec PEL, la coloration à la Thioflavine-S a été réalisée dans les tranches de souris identiques à celles utilisées pour les expériences avec le marquage 4G8. Comme attendu, cette analyse a présenté des valeurs plus faibles pour la coloration à la Thioflavine-S que pour le pourcentage de surface couverte par les structures positives au marquage 4G8 chez les souris APP/PS1 non traitées (Figure 46 E). Le nombre de plaques amyloïdes par mm² était considérablement réduit à la fois dans le cortex et dans l'hippocampe des souris traitées avec PEL (Figure 46 F). Le pourcentage de la surface du cortex et de l'hippocampe qui était recouverte de plaques a également été réduit d'environ 4 fois par le traitement PEL comparé aux souris non-traitées (Figure 46 G). Dans l'ensemble, ces données

suggèrent que PEL est capable de réduire de manière significative la charge amyloïde dans le cerveau des souris APP/PS1. A l'inverse, aucune modification des niveaux de protéines totales APP, A β , phospho APP (pThr668) ou APP-CTFs a été observée lors de l'analyse par western blot (Figure 46 H, I).

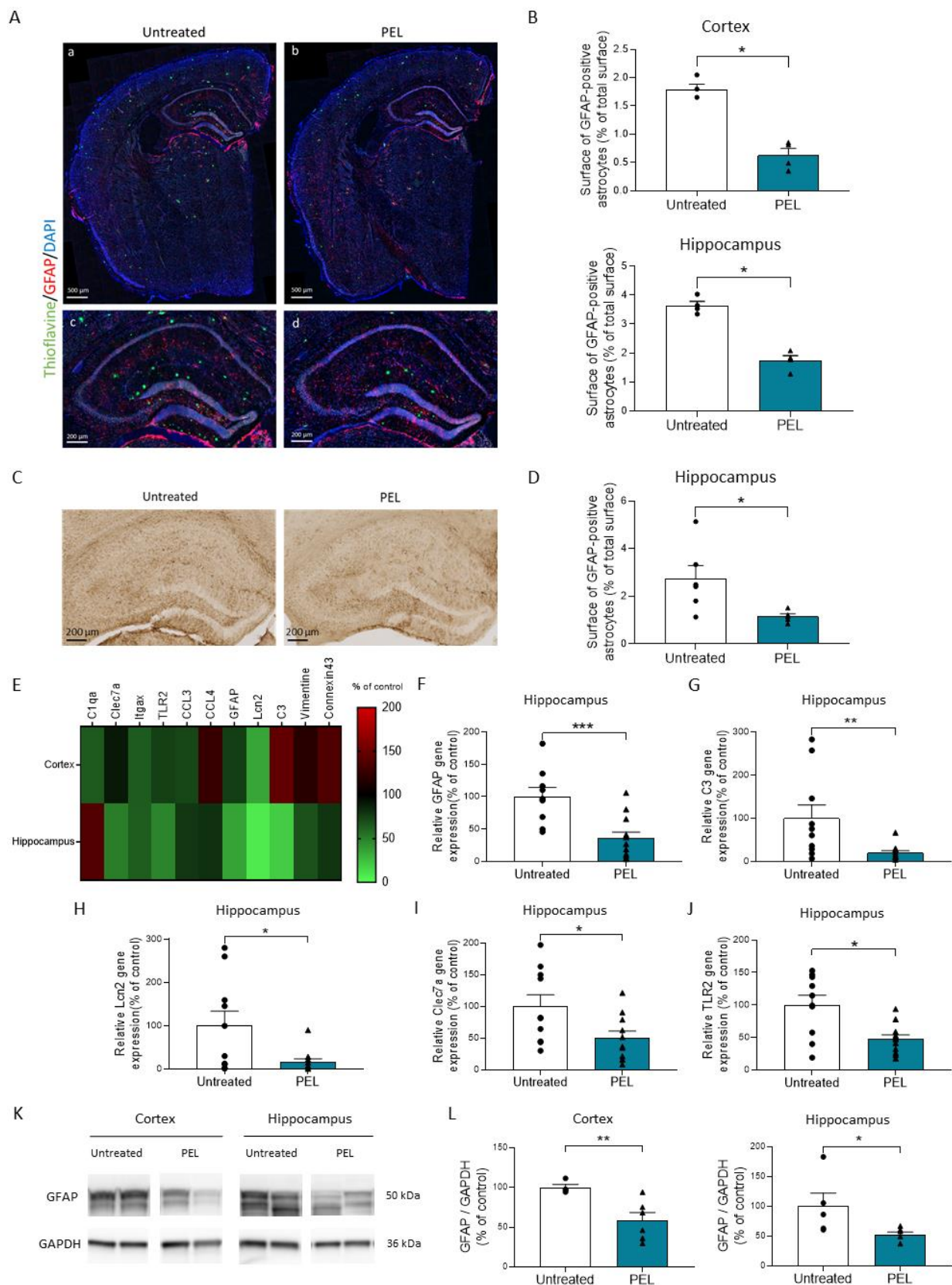


Figure 47 : Le traitement PEL diminue l'astroglie et l'inflammation dans les souris APP/PS1. A. Images représentatives du marquage avec la Thioflavine-S (vert), le DAPI (bleu) et le marqueur d'astrocyte réactif GFAP (rouge) dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. Panneaux supérieurs : barre d'échelle = 500 μ m ; Panneaux inférieurs : barre d'échelle = 200 μ m.

B. Le pourcentage de la surface totale couverte par les astrocytes positifs à la GFAP a été étudié dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. Tant dans le cortex que dans l'hippocampe, la surface des astrocytes positifs pour la GFAP s'est avérée significativement diminuée (N = 4 par groupe). C. Images représentatives de l'immunomarquage GFAP dans l'hippocampe des souris APP/PS1 de 12 mois traité avec de l'eau ou PEL. Barre d'échelle = 200 μ m. D. La surface occupée par les astrocytes positifs pour la GFAP s'est avérée significativement diminuée dans l'hippocampe des animaux traités avec PEL par rapport aux APP/PS1 non traités (N = 5-6 par groupe). E. Heat-map des gènes exprimés par les astrocytes et de la microglie activés dans le cortex et l'hippocampe de souris APP/PS1 traitées avec PEL, exprimé en pourcentage du contrôle APP/PS1 non traité (rouge : augmentation de l'expression ; vert : diminution de l'expression). F, G, H, I, J. Expression relative des gènes *GFAP*, *C3*, *Lcn2*, *Clec7a* et *TLR2* dans l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées avec PEL, exprimé en pourcentage des APP/PS1 non traités (N=9-13 par groupe). K. Analyse semi-quantitative par western blot de la synthèse de la GFAP dans le cortex et l'hippocampe de souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. L. Histogrammes représentant les niveaux de protéine GFAP dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées et non traitées avec PEL (N = 4-6 par groupe). La significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par * : $p < 0,05$.

Chez les souris APP/PS1, une augmentation du nombre d'astrocytes GFAP+ est observée après 6 mois, notamment autour des plaques amyloïdes (Kamphuis et al., 2012). Comme il a été démontré précédemment que PEL affectait l'astrogliose dans un modèle murin de tauopathie (Tautou et al, 2021), le marquage par immunofluorescence avec la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) a été utilisé pour étudier l'étendue de l'activation astrocytaire dans des tranches de cerveau de souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL (Figure 47A). Chez les souris APP/PS1 traitées par PEL, le pourcentage de la surface du cortex et de l'hippocampe recouverte par les astrocytes positifs pour la GFAP était fortement réduit par rapport aux animaux non traités (Figure 47B). De même, le marquage immunohistologique a révélé une diminution significative du pourcentage de surface couverte par les astrocytes activés dans l'hippocampe de souris APP/PS1 traitées avec PEL (Figure 47C, D). Comme une augmentation du marquage GFAP seul n'est plus considéré comme un marqueur suffisant pour classer un astrocyte comme réactif, nous avons étudié par qPCR d'autres marqueurs astrocytaires dont l'augmentation a été démontrée dans les astrocytes réactifs (Escartin et al., 2021), ainsi que certains marqueurs d'activation microgliale. Les résultats montrent que l'expression génique de la plupart des marqueurs étudiés ont été diminués dans le cortex des animaux traités par rapport aux souris APP/PS1 non traitées, mais les changements les plus importants ont été observés dans l'hippocampe, où 10 marqueurs sur les 11 testés ont été diminués, dont 5 de manière significative (Figure 47E). L'ARNm de la GFAP a été diminué, ainsi que celui de deux autres protéines sécrétées par les astrocytes réactifs, *C3* et *Lcn2* (Figure 47F, G, H). De plus, deux marqueurs de la microglie *TLR2* et *Clec7a*, importants dans les processus de neuroinflammation (Liu et al., 2012; Krasemann et al., 2017), ont également été

significativement réduits chez les animaux traités avec PEL (Figure 47I, J). En accord avec les résultats précédents obtenus, les niveaux de synthèse de la protéine GFAP ont également diminué à la fois dans l'hippocampe et dans le cortex des souris APP/PS1 traitées avec PEL (Figure 47K, L). Dans l'ensemble, l'astroglie et l'activation de gènes microgliaux chez les souris APP/PS1 sont toutes deux considérablement réduites par un traitement curatif avec PEL et ce processus pourrait contribuer à l'amélioration de l'amyloïdopathie et des troubles de la mémoire constatées chez nos souris APP/PS1 traitées avec PEL.

La synthèse de BACE1, sa localisation cellulaire et son activité sont contrôlées par plusieurs facteurs. PEL possède une activité β -secrétase non-compétitive *in vitro* (Gay et al., 2018b), nous avons donc étudié si certains facteurs de régulation, notamment PP2A, GGA1 et l'expression de BACE1 elle-même n'étaient pas modulés par notre traitement.

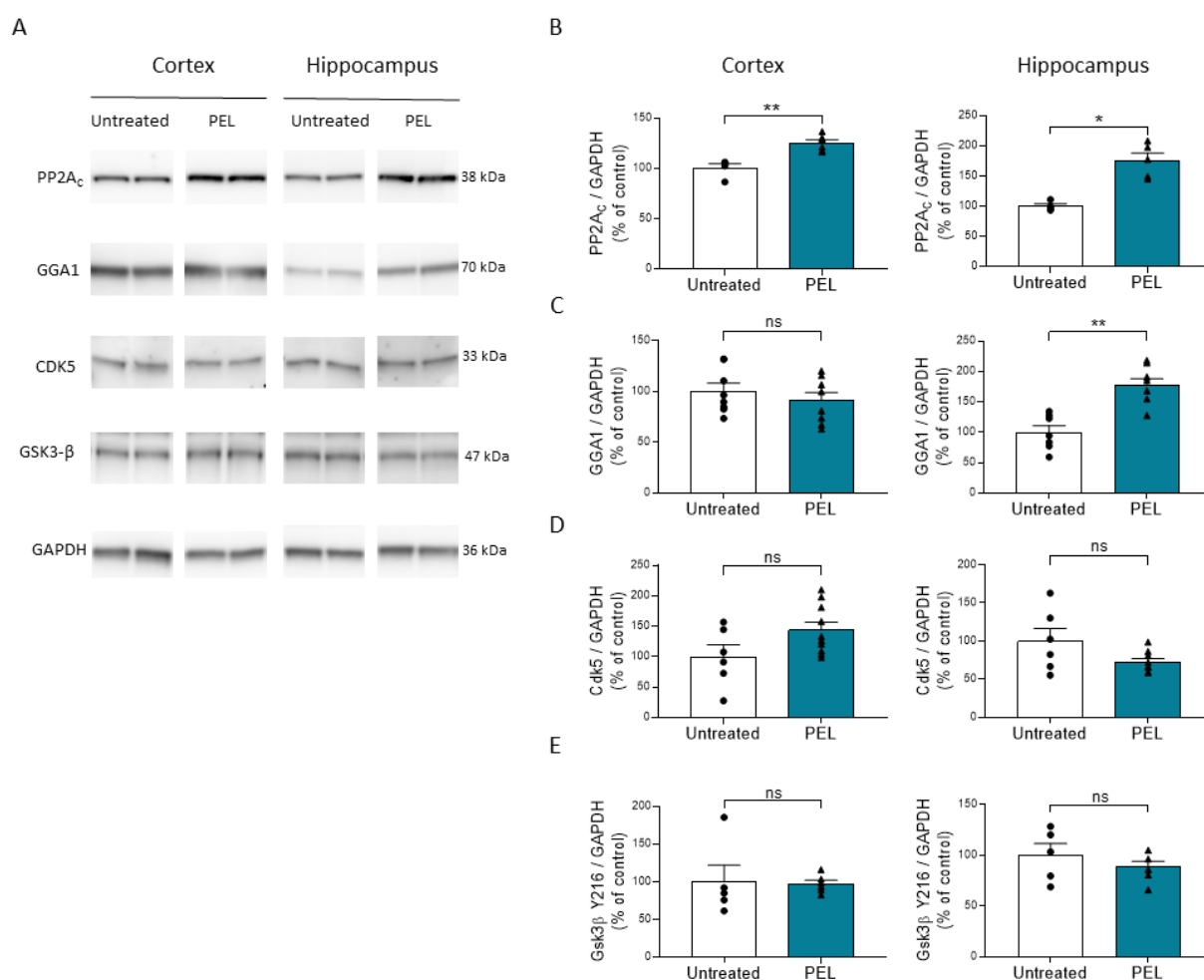


Figure 48 : **Le traitement PEL augmente la synthèse des protéines PP2A_c et GGA1 chez les souris APP/PS1.** A. Analyse semi-quantitative par western blot réalisée dans le cortex et l'hippocampe des

souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. B. Histogrammes représentant les niveaux de synthèse des protéines PP2A_C, GGA1, CDK5 et Gsk3- β dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées avec PEL, exprimés en pourcentage du contrôle non-traité. La synthèse de PP2A_C a été significativement augmentée à la fois dans le cortex et dans l'hippocampe et la synthèse de GGA1 a été augmentée dans l'hippocampe. L'analyse n'a révélé aucun changement dans l'expression de CDK5 et Gsk3- β (N = 4-8 par groupe). La significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$, ns : non significatif.

Etant donné que la principale sérine/thréonine phosphatase de Tau PP2A (Liu et al., 2005) était augmentée dans un modèle de tauopathie hippocampique sous traitement PEL (Tautou et al., 2021), nous avons voulu étudier par western blot si le niveau de synthèse de PP2A était également augmenté chez les souris APP/PS1 traitées avec PEL. En effet, le traitement de 4 mois avec PEL a fortement augmenté la synthèse de la sous-unité catalytique PP2A_C dans l'hippocampe et le cortex des animaux (Figure 48A, B), conformément aux résultats obtenus dans le modèle de tauopathie. Afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes d'action de PEL, nous avons examiné le profil de synthèse de la protéine GGA1. Il a été démontré que les protéines de liaison au facteur de ribosylation ADP localisées dans le Golgi (GGA) interagissent avec le domaine cytoplasmique de BACE1 d'une manière dépendante de l'état de phosphorylation de ce dernier et régulent son trafic endocytaire (Wahle et al., 2005), modifiant par la suite le traitement protéolytique de l'APP (von Arnim et al., 2006). Ainsi, GGA1 est essentiel pour médier le trafic rapide de BACE1 phosphorylé vers les endosomes de recyclage et limiter la production de métabolites toxiques (Toh et al., 2018). Ici, le traitement PEL a permis d'augmenter de manière significative les niveaux de synthèse de la protéine GGA1 dans l'hippocampe, mais pas dans le cortex (Figure 48C). La production des kinases CDK5 et GSK3- β , impliquées dans l'hyperphosphorylation des protéines Tau et APP et entraînant plusieurs changements pathologiques, a également été étudiée (Chang et al., 2006; Vossel et al., 2015; Liu et al., 2016). Les niveaux de synthèse des kinases CDK5 et GSK3- β sont restés inchangés à la fois dans l'hippocampe et le cortex des souris APP/PS1 traitées avec PEL (Figure 48D, E).

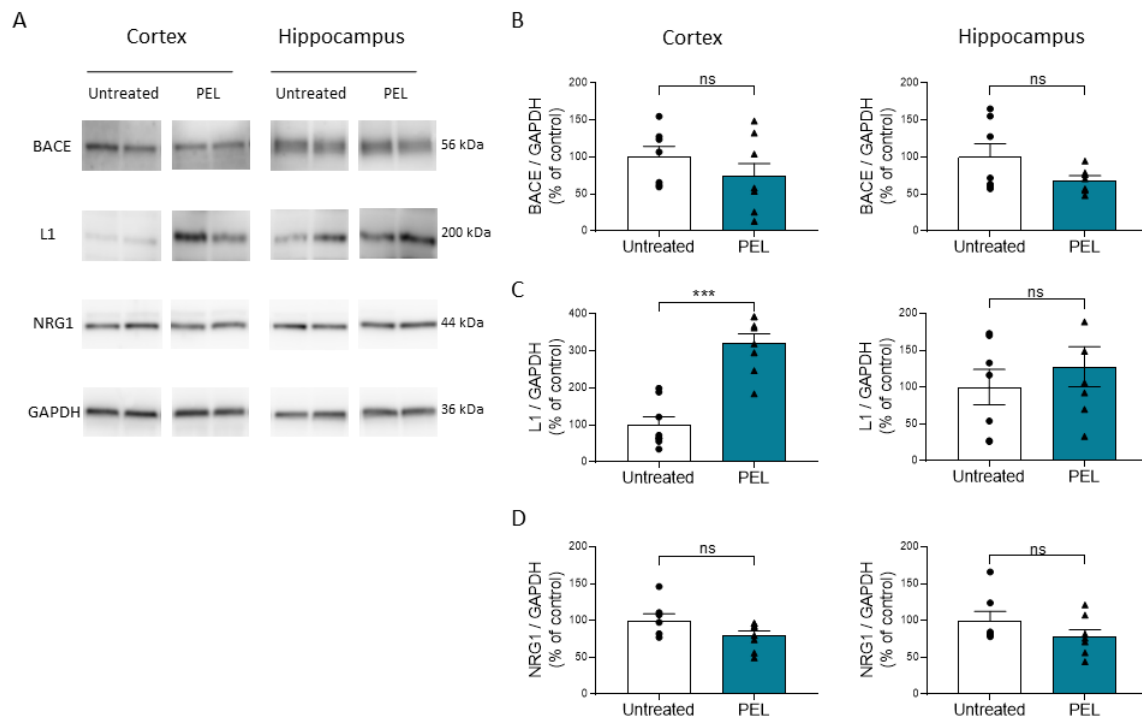


Figure 49 : **Le traitement PEL augmente la synthèse de L1 dans le cortex.** A. Analyse semi-quantitative par western blot réalisée dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. B. Histogrammes représentant les niveaux de synthèse des protéines BACE1, L1 et NRG1 dans le cortex et l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées et non avec PEL, exprimés en pourcentage du contrôle non-traité. La production de BACE1 a été diminuée de manière non significative à la fois dans le cortex et dans l'hippocampe et la production de L1 a été augmentée dans le cortex. L'analyse n'a révélé aucun changement dans l'expression de NRG1 (N = 7-8 par groupe). La significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par *** : $p < 0,001$, ns : non significatif.

Les niveaux de synthèse de la protéine BACE1 après le traitement avec PEL ont été diminués à la fois dans le cortex et l'hippocampe, mais pas de manière significative (Figure 49A, B). Nous avons également étudié l'influence du traitement avec PEL sur la production de deux autres substrats de BACE1, NRG1 et L1 (Willem et al., 2006; Zhou et al., 2012; Hu et al., 2016a). Les niveaux de synthèse de NRG1 dans le cortex et l'hippocampe n'ont pas été modifiés par le traitement. Cependant, un niveau accru de production de L1 a été trouvé dans le cortex, mais pas dans l'hippocampe (Figure 49C, D).

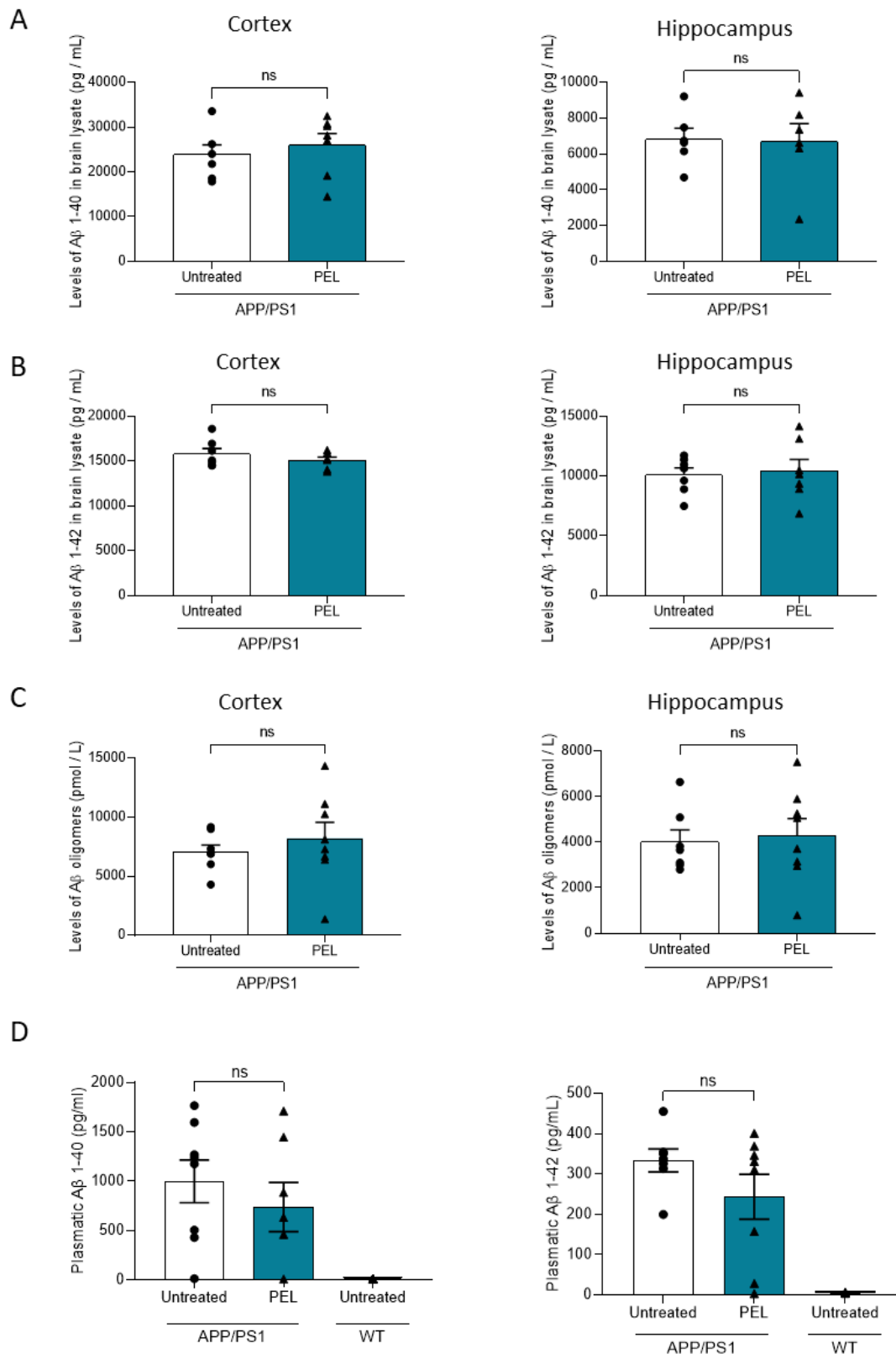


Figure 50 : **Le traitement PEL ne modifie pas les niveaux d'A β 1-40, A β 1-42 et des oligomères d'A β dans les souris APP/PS1.** A. Les niveaux d'A β 1-40 ont été déterminés dans les tissus du cortex et de l'hippocampe des souris traitées ou non avec PEL grâce à un ELISA. B. Les niveaux d'A β 1-42 ont été déterminés dans le cortex et l'hippocampe des souris traitées ou non avec PEL grâce à un ELISA. C. Les niveaux d'oligomères d'A β ont été déterminés dans les tissus du cortex et de l'hippocampe des souris traitées ou non avec PEL grâce à un ELISA. D. La quantité plasmatique d'A β 1-40 et d'A β 1-42 a

été quantifiée dans le plasma des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL grâce à un dosage ELISA. NS indique qu'aucune significativité au test statistique de Mann-Whitney a été obtenue.

Afin d'investiguer si le traitement avec PEL entraînait une modification des niveaux des peptides A β dans le cerveau des souris APP/PS1, les niveaux d'A β 1-40 et d'A β 1-42 ont été quantifiés par ELISA dans les lysats de tissus du cortex et de l'hippocampe. Aucune modification des niveaux de ces formes du peptide A β n'a été constatée dans les souris APP/PS1 traitées avec PEL (Figure 50 A, B). Les niveaux d'oligomères d'A β ont également été étudiés par ELISA dans le cortex et l'hippocampe des animaux traités avec PEL et aucune différence avec les animaux non traités n'a été observée (Figure 50 C). Afin d'évaluer si PEL pouvait avoir un effet sur la clairance plasmatique des peptides A β , le taux de peptides A β 1-40 et d'A β 1-42 a ensuite été mesuré dans le plasma des animaux traités avec PEL ou n'ayant pas reçu de traitement. De même, le traitement avec PEL n'a entraîné aucune modification des taux d'A β plasmatique dans les souris APP/PS1.

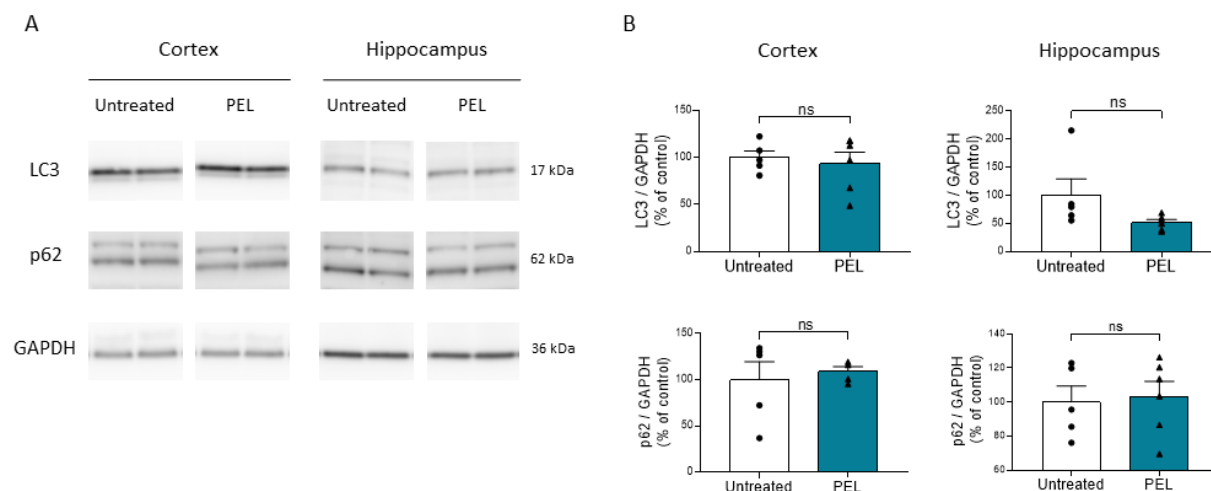


Figure 51 : PEL n'a pas modifié les niveaux de synthèse des marqueurs de l'autophagie p62 et LC3. A. Analyse semi-quantitative par western blot des lysats de cortex et d'hippocampes des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. B. Histogrammes représentant les niveaux de production de p62 et LC3 dans le cortex et l'hippocampe des animaux APP/PS1 exprimés en pourcentage du contrôle non traité. L'analyse n'a révélé aucun changement dans la production de ces deux protéines (N = 7-8 par groupe). La non-significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par NS.

Nous avons investigué les protéines liées au flux autophagique et l'influence que PEL pouvait avoir sur celles-ci *in vivo*. Comme attendu d'après les résultats obtenus *in vitro*, PEL n'a eu aucun impact sur la macroautophagie dans le modèle APP/PS1 et n'a pas modifié les niveaux de synthèse de p62 et LC3B (Figure 51).

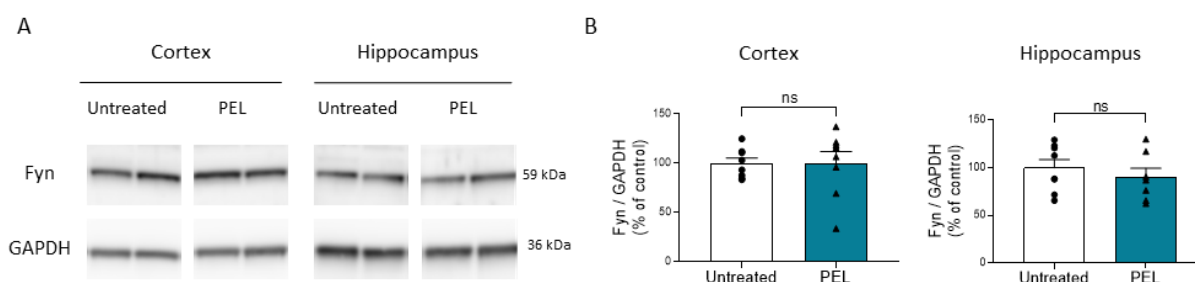


Figure 52 : **PEL n'a pas impacté les niveaux de synthèse de la protéine synaptique Fyn.** A. Analyse semi-quantitative par western blot des lysats de cortex et d'hippocampes des souris APP/PS1 traitées ou non avec PEL. B. Histogrammes représentant les niveaux de synthèse de Fyn dans le cortex et l'hippocampe des animaux APP/PS1 exprimés en pourcentage du contrôle non traité. L'analyse n'a révélé aucun changement dans la production de Fyn dans chacune des structures cérébrales (N = 7-8 par groupe). La non-significativité au test statistique de Mann-Whitney est indiquée par NS.

Etant donné l'importance de la protéine Fyn dans la médiation de la toxicité synaptique d'A β par la protéine Tau (Um et al., 2012; Nygaard, 2018), il était intéressant de regarder si la molécule PEL possédait une action sur cette protéine clé dans le modèle APP/PS1. Les analyses en western blot ont révélé que le traitement avec PEL n'avait pas impacté les niveaux de synthèse de la protéine Fyn dans notre paradigme curatif (Figure 52).

Ensemble, ces résultats montrent que PEL est capable de restaurer les fonctions cognitives, de diminuer l'agrégation des peptides A β en plaques amyloïdes et de diminuer l'inflammation dans le modèle de souris APP/PS1. Nous avons également démontré que cet effet pourrait être médié par une baisse de l'astroglie induite par PEL, ainsi que par une augmentation de la phosphatase PP2A_C et de la protéine GGA1. Cette étude a donc permis de mettre en évidence que PEL est efficace sur la pathologie amyloïde *in vivo*.

DISCUSSION

Discussion, conclusion et perspectives

La MA est multifactorielle, ce qui rend longue et complexe la mise au point d'une thérapie. La communauté scientifique est constamment à la recherche de nouveaux composés actifs, et l'identification d'une famille de molécules dérivées de la chloroquine par notre laboratoire a permis d'initier une voie thérapeutique potentielle. Une stratégie de relation structure-activité a été utilisée afin de comparer deux composés, PEL et MAGS qui ne différaient que par un seul atome d'azote et qui possédaient un effet de repression non-compétitive de la β -secrétase. Toutefois, l'activité lysosomotropique n'était associée qu'à la molécule MAGS *in vitro* (Gay et al., 2018b). Cette activité lysosomotropique est commune à plusieurs composés dérivés originellement de la chloroquine (Melnik et al., 2015). Grâce à l'alcalisation du pH intravésiculaire, l'activité lysosomotropique de la chloroquine inhiberait l'activité β -secrétase dépendante du pH et réprimerait le flux autophagique (Schrader-Fischer and Paganetti, 1996; Tam et al., 2014). Il apparaît donc essentiel de déterminer laquelle de ces deux activités est importante pour l'activité thérapeutique. Dans la première partie de cette étude, nous avons montré que le composé modulateur de l'activité de la β -secrétase PEL réduisait la pathologie Tau, augmentait la production de la phosphatase PP2A_C, diminuait les astrocytes activés positifs à la GFAP et améliorait la mémoire spatiale à court-terme dans le modèle murin transgénique de dégénération neurofibrillaire THY-Tau22. Ces résultats suggèrent donc que la molécule PEL, qui régule le métabolisme de l'APP *in vitro*, permet d'atténuer la pathologie Tau *in vivo* dans un paradigme curatif. En revanche, la molécule MAGS n'a démontré aucun effet à dose équivalente sur la pathologie Tau ou l'inflammation dans le modèle THY-Tau22. Le dosage de MAGS et de PEL dans le tissu cérébral des souris traitées a montré une accumulation de MAGS dans le cerveau contrairement à PEL (concentration de 3 à 10 fois plus importante). Cette accumulation pourrait contribuer à l'inefficacité de MAGS et pourrait à terme s'avérer délétère. La question se pose de savoir si un dosage plus faible permettrait d'obtenir une meilleure efficacité dans le cas de cette molécule. De plus, la chloroquine et les molécules ayant une activité lysosomotropique inhibent le flux autophagique, cet effet ayant été montré précédemment *in vitro* pour MAGS (Gay et al., 2018b). Plusieurs marqueurs de l'autophagie, dont mTOR et sa cible en aval p70S6K (Lipton and Sahin, 2014), ainsi que p62 et LC3, ont été analysés, et aucune modulation n'a été observée *in vivo* après 7 semaines de traitement dans les animaux THY Tau22. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité lysosomotropique n'est

pas nécessaire pour l'activité *in vivo* de nos composés, alors que l'activité modulatrice de la β -secrétase est plus probablement essentielle.

Bien qu'une relation directe entre les aspartyl protéases BACE1 ou BACE2 et la production de la protéine Tau n'ait pas encore été établie, de plus en plus d'études suggèrent une interaction entre la protéine Tau et la résultante du clivage de la protéine APP par la β -secrétase. Il a été démontré que les inhibiteurs de la β -secrétase ou les modulateurs de la γ -secrétase diminuent la production de protéines Tau dans des neurones corticaux excitateurs dérivés de cellules souches humaines (Moore et al., 2015). Après le traitement des souris THY-Tau22 avec PEL, la phosphorylation de la protéine Tau a été réduite aux sites hyperphosphorylés et aux sphospho-sites pathologiques. De plus, la fraction insoluble de Tau ainsi que le nombre d'enchevêtrements neurofibrillaires ont été réduits. Cependant, la diminution de la phosphorylation de Tau n'a pas été suivie d'une augmentation de la clairance plasmatique de Tau, ce qui suggère que les effets positifs observés avec le traitement PEL sur la diminution de la pathologie Tau ne sont pas liés à un changement dans la clairance plasmatique de la protéine Tau. Cette modulation de la phosphorylation de Tau pourrait être attribuée à la modification de la production de la phosphatase PP2A, car il existe une relation inverse entre l'hyperphosphorylation de Tau aux sites Ser202/Thr205 et l'activité de PP2A (Kins et al., 2003). De plus, il a été démontré que l'activation accrue de PP2A peut contribuer à la restauration des fonctions cognitives chez les souris THY-Tau22, également dans un paradigme curatif (Ahmed et al., 2020). La phosphatase PP2A est inhibée dans la MA. Il a ainsi été suggéré qu'elle contribue à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et à la régulation du métabolisme de l'APP (Taleski et al., 2021b). La synthèse de la sous-unité PP2A a été augmentée chez les souris THY-Tau22 traitées avec PEL mais pas chez les souris traitées avec MAGS, ce qui montre tout d'abord l'effet spécifique de PEL, et deuxièmement, nous pouvons supposer une relation entre la réduction de la phosphorylation de la protéine Tau et l'augmentation de la production de PP2A. L'augmentation de la synthèse de PP2A_C n'était pas associée à un changement de son état de méthylation, ce qui suggère donc que l'augmentation de l'activité de PP2A est plus probablement la conséquence d'une production accrue de cette phosphatase que d'un changement de son état de méthylation/déméthylation. Chez les souris traitées avec PEL, la fraction insoluble de Tau a été réduite indiquant que la proportion de Tau agrégée a été diminuée, ce qui a eu pour effet de diminuer les processus dégénératifs neurofibrillaires existants, d'inhiber ces processus, ou les deux. Ces résultats sont renforcés par la diminution significative du nombre de DNF dans le cerveau des animaux traités avec PEL. Nous avons

donc démontré dans cette étude que PEL peut diminuer la phosphorylation de Tau et la DNF *in vivo*, contribuant ainsi à la restauration de la mémoire spatiale à court-terme et à l'amélioration de la pathologie Tau dans le cerveau des souris traitées.

Nos résultats concordent avec l'article de Moore et al. (Moore et al., 2015), dans lequel il a été montré que la manipulation du métabolisme de l'APP par inhibition de la β -secrétase entraîne une diminution de la quantité de protéines Tau, démontrant que le métabolisme de l'APP régule la protéostasie de Tau. Un tel effet modulateur de l'APP et de Tau a également été obtenu avec un activateur de l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA), suggérant en outre une autre voie thérapeutique par l'activation au lieu de l'inhibition du flux autophagique (Bourdenx et al., 2021). Nos données suggèrent que la modulation du métabolisme de l'APP avec de petites molécules peut affecter non seulement les niveaux de protéines Tau, mais aussi le processus de dégénérescence neurofibrillaire, et à son tour améliorer les fonctions cognitives. Peu d'études portant sur des inhibiteurs/modulateurs de la β -secrétase ont démontré qu'ils restauraient ou atténuent les déficits comportementaux et de la mémoire dans des modèles de souris transgéniques de la MA (Imbimbo and Watling, 2019; Sergeant et al., 2019). La recherche de thérapies pour les maladies neurodégénératives a proposé plusieurs petites molécules différentes comme candidates ciblant les lésions A β ou Tau (Morimoto et al., 2013; Lecoutey et al., 2014; Yahiaoui et al., 2016), y compris des modulateurs d'autophagie (Silva et al., 2020; Bourdenx et al., 2021), mais à notre connaissance, aucun d'entre eux, sauf certains modulateurs de l'autophagie (Bourdenx et al., 2021) dont les molécules du laboratoire, n'agit à la fois sur la pathologie Tau et la pathologie amyloïde. En plus d'être les protéases nécessaires à la production des peptides A β , BACE1 et BACE2 dégradent également les peptides A β (Abdul-Hay et al., 2012). Ainsi, les inhibiteurs actuels peuvent également affecter la dégradation des peptides A β par une répression incomplète de l'activité aspartyl protéase des protéases BACE (Liebsch et al., 2019). Comme PEL n'est pas un inhibiteur enzymatique direct de BACE1, ce composé peut moduler différemment le métabolisme de l'APP et donc potentiellement empêcher l'effet délétère des inhibiteurs complets de la β -secrétase.

L'astroglie est une réponse inflammatoire qui potentialise la progression des maladies neurodégénératives et peut être considérée comme une cible thérapeutique potentielle (Phillips et al., 2014; Chung et al., 2015). Les astrocytes ont une fonction de régulation des synapses et de la plasticité neuronale, et, par exemple, la réduction spécifique de la connexin43 dans les astrocytes réduit la déficience mnésique chez les souris APP/PS1 (Ren et al., 2018). La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) est l'une des principales protéines de filaments intermédiaires

dans les astrocytes ; elle possède de nombreux rôles cruciaux, elle serait notamment impliquée dans les interactions entre les astrocytes et les neurones (McCall et al., 1996; Emirandetti et al., 2006), le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et la myélinisation (Liedtke et al., 1996; Pekny et al., 1998), ou encore la protection après une lésion neuronale (Tanaka et al., 2002; Otani et al., 2006). Les niveaux d'astrocytes réactifs positifs à la GFAP sont étroitement associés à la démence dans la MA (Perez-Nievas et al., 2013). Plus récemment, il a été démontré que l'accumulation d'astrocytes sénescents favorise la formation d'agrégats de Tau hyperphosphorylée, et que la réduction des astrocytes sénescents protège le modèle de souris transgéniques Tau PS19 du déclin cognitif et diminue la pathologie Tau (Bussian et al., 2018). Ces études montrent ainsi une interaction étroite entre la pathologie Tau et l'astrogliose. Ici, nous avons montré que les astrocytes réactifs positifs à la GFAP étaient réduits dans les souris THY-Tau22 traitées avec PEL par rapport aux souris non-traitées. Cette réduction des astrocytes réactifs pourrait résulter soit de l'effet direct de PEL sur les astrocytes, soit indirectement de la réduction de la pathologie Tau. La suppression de l'expression de *MAPT* dans le modèle double transgénique APP/PS1×rTg4510 a réduit la DNF et l'astrogliose (DeVos et al., 2018). Ces résultats combinés pourraient indiquer que la réduction de l'astrogliose dans le modèle THY-Tau22 traité avec PEL pourrait être attribuée en partie à un effet direct de PEL. Cette réduction de l'astrogliose peut également contribuer à l'amélioration cognitive observée chez les animaux traités avec PEL.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que PEL était capable de diminuer la pathologie amyloïde dans le modèle d'amyloïdogenèse APP/PS1. En effet, nos résultats montrent qu'un traitement curatif dans des souris APP/PS1 de 8 mois avec PEL pendant 4 mois restaure la mémoire spatiale à court- et long-terme et diminue la pathologie amyloïde dans ce modèle transgénique. Nous montrons que cet effet de restauration, comme dans les THY-Tau22, s'accompagne d'une réduction de l'astrogliose et de la neuro-inflammation, et également d'une augmentation des niveaux d'expression de PP2A_C et de GGA1. Le traitement avec PEL en curatif a permis de diminuer le nombre de plaques de petite taille (entre 50µm² et 250µm²) marquées avec l'anticorps 4G8, sans modification apparente des plaques de plus grande taille (250µm²-500µm²) avec cet anticorps. Nous avons donc décidé d'effectuer un marquage avec la Thioflavine-S, qui contrairement à l'anticorps 4G8 ne marque pas toutes les structures Aβ mais uniquement les grosses plaques matures à cœur dense afin d'avoir une analyse plus précise. Le marquage avec la Thioflavine-S a révélé que les grosses

plaques amyloïdes étaient également diminuées par le traitement avec PEL, mais pas les niveaux totaux d'A β ni les CTF- α et β . PEL n'a pas influencé non plus les niveaux d'APP total ni sa phosphorylation sur la thréonine 668 (Chang et al., 2006). Une molécule thérapeutique peut soit retarder l'apparition des lésions, soit stabiliser leur nombre si la molécule agit sur la formation des lésions ou sur les lésions déjà existantes. La troisième option est que la molécule possède une action étiologique, et agisse à la fois sur l'apparition des lésions et sur celles déjà existantes ce qui permet de diminuer leur nombre. Il semblerait que PEL agisse à la fois sur les lésions en formation en diminuant le nombre de petites plaques amyloïdes mais également sur les lésions existantes en diminuant les plaques amyloïdes matures, ce qui permet de voir une diminution globale du nombre de plaques amyloïdes. Comme illustré par les dosages ELISA des A β oligomériques, la formation d'oligomères ne semble pas être inhibée cependant, suggérant que l'action d'inhibition de l'agrégation de PEL interviendrait entre la formation des oligomères et la formation des plaques amyloïdes.

La quantification des niveaux d'A β 1-40 et d'A β 1-42 dans les lysats de cerveau des animaux a montré que PEL n'avait pas diminué les niveaux de peptides A β dans le tissu cérébral des souris APP/PS1 traitées. La quantité globale d'A β semble de pas avoir varié, pourtant si les plaques amyloïdes sont éliminées, il devrait y avoir une augmentation de la quantité de peptides A β dans le cerveau des souris. Or les niveaux restent stables, ce qui indique une diminution de la production des peptides A β , une augmentation de la clairance, ou les deux. Nous avons donc voulu savoir si cet effet de PEL pouvait être médié par une clairance plasmatique plus importante des peptides A β . La quantification des niveaux d'A β 1-40 et d'A β 1-42 dans le sang des animaux a montré que PEL avait diminué mais de manière non-significative les niveaux de peptides A β dans le plasma des souris APP/PS1 traitées. La tendance à la diminution non significative de la quantité d'A β 1-40 et 1-42 dans le sang des souris APP/PS1 pourrait refléter une augmentation de la clairance des peptides A β contrebalancé par l'afflux de ces peptides provenant des plaques en cours d'élimination. Les peptides A β entrant dans le sang périphérique peuvent être dégradés par des enzymes circulantes ou métabolisés dans le foie, ce qui réduit la corrélation des niveaux plasmatiques des peptides A β avec le métabolisme cérébral des peptides A β . Deuxièmement, la production d'A β en dehors du SNC par les plaquettes, les cellules musculaires squelettiques et d'autres types de cellules contribue probablement au pool circulatoire d'A β . Par conséquent, alors que le dépôt amyloïde cérébral s'accompagne d'une baisse considérable des taux d'A β 1-42 et 1-40 chez les patients Alzheimer (Janelidze et al., 2016), les effets périphériques de l'accumulation ou de l'élimination des plaques dans le

cerveau pourraient être plus dilués. L'hypothèse que le traitement PEL n'améliore pas l'élimination des protéines pathologiques via le système sanguin semble être soutenue par le fait que PEL n'a pas modifié non plus les niveaux de protéine Tau dans le plasma des souris THY-Tau22. Son effet n'est probablement pas médié non plus par une activation de la macroautophagie, car la production des protéines p62 et LC3 est retrouvée inchangée après le traitement PEL ; cependant une action sur la CMA ne peut pas être exclue. En revanche, d'après nos résultats, on pourrait émettre l'hypothèse que PEL favoriserait l'élimination des plaques amyloïdes et de la protéine Tau anormale en favorisant leur phagocytose par les astrocytes et la microglie (Nagele et al., 2003).

Il a été montré que des astrocytes réactifs avec une expression accrue de *GFAP* entourent les plaques amyloïdes dans le cerveau des malades Alzheimer (Levin et al., 2009; Kamphuis et al., 2015). Les souris APP/PS1 présentent également dès 6 mois une augmentation de l'expression de *GFAP*, une augmentation de la densité et de l'aire occupée par des astrocytes GFAP+, l'expression de davantage de gènes liés aux astrocytes réactifs et des astrocytes hypertrophiés entourant les plaques A β (Spanos and Liddelow, 2020). De manière intéressante, nos résultats ont démontré que PEL permettait une diminution significative de l'expression du gène *GFAP*, de la production de la protéine GFAP, ainsi que de la surface occupée par les astrocytes GFAP+, et donc une diminution des astrocytes dits réactifs à la fois dans le cortex et dans l'hippocampe des souris APP/PS1.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons investigué l'effet du traitement PEL dans les souris APP/PS1 sur l'expression génique de plusieurs marqueurs spécifiques des astrocytes réactifs, tels que la vimentine, la connexine43, *C3* et *Lcn2*. L'expression de l'ensemble de ces marqueurs a été diminuée dans l'hippocampe des souris traitées avec PEL, parmi lesquels *C3* et *Lcn2* ont été significativement réduits. La protéine *C3* est retrouvée très augmentée dans le cerveau des patients Alzheimer et des souris transgéniques pour la protéine APP (Lian et al., 2015). *C3* est une cible astrocytaire de NF κ B, activé par une exposition aux peptides A β , qui va provoquer une altération de la morphologie dendritique et du fonctionnement neuronal. Cette protéine contribuerait à la neurodégénération induite par la pathologie Tau et jouerait un rôle important dans la réponse de la glie aux plaques A β (Shi et al., 2017; Wu et al., 2019). L'inhibition de *C3* a été confirmée par d'autres comme réduisant le nombre de microglies pro-inflammatoire, diminuant la perte synaptique et neuronale (Hong et al., 2016). *Lcn2* est une protéine dont l'expression augmente également dans les régions cérébrales touchées par les lésions de la MA chez les malades et a été identifié récemment comme un facteur de risque contribuant au

développement et à la progression de la MA (Song and Kim, 2018). Il semblerait que *Lcn2* sensibilise les cellules du SNC à la toxicité des peptides A β , en plus d'empêcher l'action neuroprotectrice de TNF- α dans les premiers stades de la maladie (Naudé et al., 2012). L'expression génique de ces deux marqueurs astrocytaires qui se situent au centre des lésions de la maladie d'Alzheimer ont ainsi été réduits par le traitement curatif avec la molécule PEL.

Le deuxième acteur important de la neuroinflammation est la microglie, nous avons donc également recherché les potentiels effets que PEL pourrait avoir sur ces cellules immunitaires grâce à plusieurs gènes caractéristiques de la microglie activée ou réactive, comme *C1qa*, *Clec7a*, *Itgax* et *TLR2*. Les résultats obtenus montrent que l'expression de ces gènes étaient réduites dans l'hippocampe des souris traitées avec PEL à l'exception de *C1qa*. Il est surtout important de noter que l'expression des gènes *Clec7a* et *TLR2* est significativement diminuée consécutivement traitement avec PEL. TLR2 est un récepteur microglial important pour le déclenchement de la neuroinflammation par les peptides A β et qui est retrouvé surexprimé dans la MA (Liu et al., 2012). L'inhibition de TLR2 diminue la réactivité des cellules gliales, réduisant les dépôts d'A β et améliorant les fonctions cognitives dans des modèles APP/PS1 (McDonald et al., 2016b). Ces résultats sont supportés par ceux d'autres équipes démontrant que la déficience en récepteur TLR2 diminue les dommages oxydatifs et l'inflammation induite par A β 1-42 et augmente également la clairance des peptides A β (Jana et al., 2008; Fiebich et al., 2018). De plus, TLR2 semble primordial dans la détermination du profil neuroprotecteur ou neurotoxique de la microglie (Lax et al., 2020). *Clec7a* est un gène associé aux microglies activées (disease-associated microglia ou DAM), surexprimé dans des modèles APP/APOE et APP/PS1 (Fitz et al., 2020; Wang et al., 2020). *Clec7a* a été identifié comme un acteur principal de la transition vers un phénotype de microglie réactive, associé à la neurodégénération et au vieillissement (Holtman et al., 2015). La réduction des dépôts de peptides A β observée avec le traitement avec PEL pourrait ainsi être une conséquence secondaire de la réduction de l'astrogliose et de la microgliose que nous observons, puisque à la fois les astrocytes et la microglie proinflammatoire activée ont été mis en évidence comme aggravant la quantité de plaques amyloïdes et entretiennent donc la pathologie amyloïde et la pathologie Tau.

Plusieurs études démontrent que les concentrations plasmatiques de GFAP sont élevées chez les adultes âgés cognitivement normaux à risque de MA (Delacourte and Buée, 1989). Ces observations suggèrent que l'activation ou les dommages astrocytaires commencent à partir du stade pré-symptomatique de la MA et sont associés à la charge d'A β cérébrale (Chatterjee et al., 2021). Les dépôts d'A β au stade précoce pourraient ainsi interagir avec la réponse

inflammatoire indiquant l'astrocytose comme une force motrice avec une contribution précoce dans la pathologie Alzheimer (Schöll et al., 2015). Récemment, il a été montré que la GFAP pouvait être un marqueur précoce de la MA et qu'elle possédait une corrélation forte avec le peptide A β (Verberk et al., 2020). Considérant le fait que les astrocytes réactifs neurotoxiques sont induits par l'activation de la microglie, la microglie pourrait même être un marqueur plus précoce encore (Liddel et al., 2017).

Selon ces travaux, il y aurait 3 vagues successives dans le cerveau des malades : une augmentation de la quantité d'A β , des astrocytes et de la microglie, probablement afin de limiter les dommages à la proximité immédiate des plaques amyloïdes, puis une deuxième phase avec une diminution d'A β et des astrocytes pouvant refléter une clairance inefficace des plaques suivie de l'apparition de la pathologie Tau. Dans la troisième phase, il y aurait une augmentation concomitante des trois lésions, inflammation, Tau et amyloïde, avec sûrement des astrocytes et une microglie réactifs cette fois-ci, entraînant des conséquences délétères et la mise en place d'un cercle vicieux où l'inflammation et les pathologies Tau et amyloïdes s'auto-entretiennent. Contribuer à garder ou à ramener les astrocytes et la microglie dans cette étape de clairance et de phagocytose avant la phase d'activation et d'aggravation de la pathologie comme la molécule PEL semble le faire pourrait ainsi être une stratégie thérapeutique intéressante.

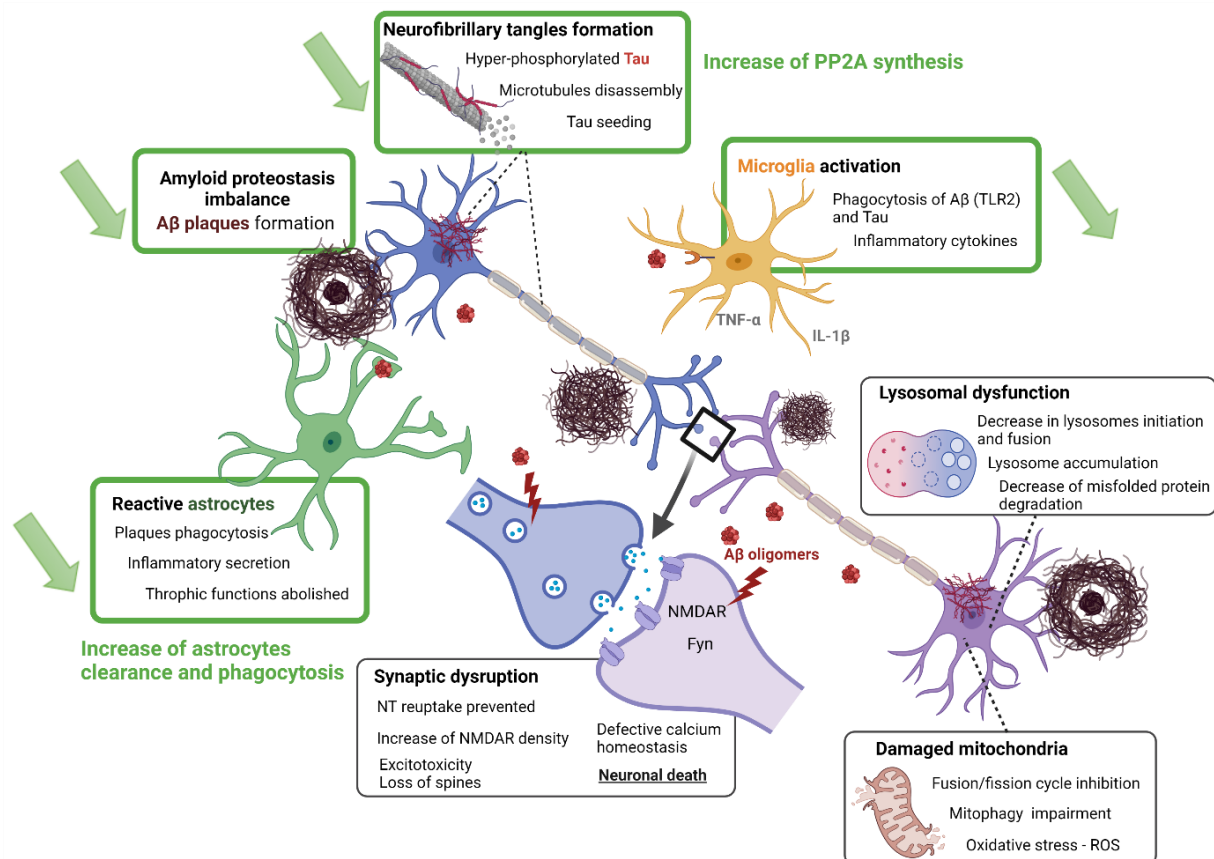


Figure 53 : PEL diminue le nombre de plaques amyloïdes et la phosphorylation de la protéine Tau probablement via une action sur la phosphatase PP2A et les acteurs de l'inflammation. PEL est donc une molécule capable d'impacter à la fois les plaques amyloïdes, dont il semblerait qu'elle diminue l'agrégation à un certain stade, et qui a également un impact sur l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau en empêchant la formation de dégénérescences neurofibrillaires ; potentiellement grâce à une augmentation de la déphosphorylation de Tau médiée par la phosphatase PP2A. Ces effets sur la protéine Tau et sur les peptides amyloïdes sont accompagnés d'une diminution de l'inflammation médiée par les astrocytes et la microglie. D'après cette étude nous pourrions donc émettre l'hypothèse que PEL contribuerait à garder ou à ramener les astrocytes et la microglie dans l'étape de clairance et de phagocytose bénéfique avant la phase d'activation et d'aggravation de la pathologie, permettant ainsi une l'élimination des plaques amyloïdes et de la protéine Tau anormale en favorisant leur phagocytose.

Nos résultats renforcent l'idée que les médiateurs de l'inflammation comme les astrocytes ou la microglie sont des partenaires clés dans la mise en place des lésions de la MA et des dysfonctionnements associés dans le cerveau. Notre étude conforte la thèse qui a gagné en importance depuis plusieurs années selon laquelle il n'y aurait pas uniquement l'amyloïde et la protéine Tau impliquées dans la cascade amyloïde, et que les différents acteurs de la neuroinflammation joueraient un rôle de premier plan dans la genèse et de développement des deux autres lésions. L'inflammation est vue aujourd'hui comme la troisième composante de la maladie d'Alzheimer. La neuroinflammation ne serait pas seulement une conséquence de la progression de la MA, mais plutôt un mécanisme en amont essentiel au développement de la maladie, et donc une thérapie combinée visant à réduire la formation de plaque amyloïde et à limiter la neuroinflammation pourrait être plus efficace que de traiter chaque pathologie individuellement (Pascoal et al., 2021).

Les résultats obtenus dans le modèle APP/PS1 montrent une augmentation très significative de la phosphatase PP2A, ce qui confirme les données obtenues avec le modèle THY-Tau22 et mettent davantage en évidence le rôle majeur que semble jouer PP2A dans les effets bénéfiques médiés par PEL. Cela vient appuyer d'autres études mettant en évidence que l'augmentation de l'activité de PP2A a permis de protéger contre les dysfonctionnements induits par les peptides A β (Nicholls et al., 2016) et de diminuer la surproduction des fragments A β (Wei et al., 2020). De plus, réprimer l'inhibiteur silencieux-2 de PP2A a provoqué une atténuation à long terme de l'amyloïdogénèse chez les souris Tg2576 avec une inhibition de l'hyperphosphorylation de l'APP et de l'activité de la β -secrétase (Liu et al., 2013). Augmenter l'activité de PP2A favorise également le clivage non-amyloïdogénique de l'APP de manière dépendante de la protéine Fyn (Taleski et al., 2021b). Dans cette étude, le niveau de synthèse de la protéine Fyn n'a pas été modifié, mais il est possible que sa localisation cellulaire ou sa phosphorylation ai subi des changements à la suite du traitement avec PEL. Une augmentation de PP2A semble donc

affecter sélectivement la réponse pathologique aux niveaux élevés de A β , permettant au système cellulaire de d'atténuer la toxicité de la pathologie amyloïde.

La β -secrétase est une cible thérapeutique compliquée, du fait de ses nombreux autres substrats en dehors de l'APP, tels que L1 (L1-CAM) ou la Neuréguline-1 (NRG1) (Willem et al., 2006; Zhou et al., 2012; Hu et al., 2016). Nous avons donc voulu investiguer si ces deux autres substrats de la β -secrétase étaient affectés par le traitement avec la molécule PEL. La production de la protéine NRG1 n'a pas subi de modifications suite au traitement avec PEL dans les souris APP/PS1. En revanche, la synthèse de L1 a été augmentée drastiquement dans le cortex des animaux. Le fait que PEL ait un effet sur un autre substrat de la β -secrétase pourrait potentiellement être problématique, cependant augmenter la protéine L1 pourrait se révéler intéressant. En effet, la molécule d'adhérence des cellules L1 a été reconnue comme jouant un rôle critique dans les interactions de surface des neurones, et son importance a été notamment révélée par son activation des récepteurs tyrosine kinase du facteur de croissance des fibroblastes (FGF), du facteur de croissance épidermique (EGF) et du facteur de croissance des nerfs (NGF). Actuellement, certains traitements des troubles neurodégénératifs et des déficits cognitifs visent à augmenter cette molécule L1 (Colombo and Meldolesi, 2015). Il est important de noter également que l'augmentation de la production de L1 peut entraîner l'activation des phosphatases dans les neurones (Klinz et al., 1995). On pourrait alors émettre l'hypothèse que L1 ferait partie de la voie d'activation de PP2A et serait également un médiateur de l'activité de PEL sur les différentes composantes pathologiques de la MA. Cette piste de régulation et signalisation nécessite cependant des analyses complémentaires.

Les résultats ont montré que la molécule PEL augmente également l'activité d'une autre protéine, GGA1, dans l'hippocampe des souris APP/PS1 traitées. Ce résultat est intéressant car GGA1 est impliqué dans l'adressage de la β -secrétase dans les endosomes et permet de faire transiter rapidement la β -secrétase des endosomes précoces (lieu de rencontre privilégié entre la β -secrétase et APP) aux endosomes de recyclage, ce qui limite la génération d'A β . La surexpression de *GGA1* permet de réduire le clivage de l'APP par la β -secrétase et la sécrétion de peptides A β , et la modulation du traitement de l'APP par GGA1 est indépendante d'une interaction directe des deux protéines (von Arnim et al., 2006; Wahle et al., 2006). Ainsi, les protéines GGA pourraient être impliquées dans la pathogenèse de la MA. De plus, l'expression de *GGA1* est retrouvée diminuée dans la MA. GGA1 pourrait donc contribuer à l'effet bénéfique observé après traitement avec la molécule PEL, via une action de PEL sur GGA1,

qui permettrait une ségrégation spatiale entre la β -secrétase et son substrat la protéine APP, diminuant ainsi la production de peptides A β .

Étant donné que la β -secrétase peut cliver d'autres substrats en dehors de l'APP, une inhibition excessive de la β -secrétase a été mise en avant pour expliquer les problèmes de toxicité observés avec les candidats médicaments précédents, alors que des niveaux plus faibles d'inhibition pourraient amener à l'efficacité thérapeutique souhaitée (Hampel et al., 2021). Ainsi, malgré les échecs antérieurs des essais cliniques sur les inhibiteurs de la β -secrétase, cette enzyme demeure une cible thérapeutique de premier plan pour stopper ou ralentir la progression de la MA et de nouvelles stratégies potentielles d'inhibition de la β -secrétase sont actuellement mises en œuvre (Netzer et al., 2017). Nous n'avons pas observé de baisse de la production de protéine BACE1 avec le traitement PEL, mais il faudra confirmer une éventuelle baisse d'activité *in vivo*, car il semblerait que l'activité de nos molécules soit différente entre l'*in cellulo* et l'*in vivo*. En effet, il semblerait que MAGS ne possède plus son activité lysosomotropique *in vivo*, il se pourrait que l'activité β -secrétase ne soit plus au premier plan dans des modèles plus complexes comme les modèles murins et que la cible véritable de PEL se trouve au niveau des médiateurs de l'inflammation que sont les astrocytes et la microglie, et/ou au niveau d'une cascade de signalisation impliquant la phosphatase PP2A.

Ensemble, ces données indiquent que la molécule PEL, mais pas MAGS, conduit à une restauration des fonctions cognitives ainsi qu'à une réduction de la pathologie Tau et de l'astrogliose dans le modèle transgénique de pathologie Tau hippocampique THY-Tau22. Nous avons pu en déduire que l'activité lysosomotropique était alors dispensable pour obtenir un effet *in vivo*. Nous avons également montré que le traitement avec PEL dans un paradigme curatif réduit la pathologie amyloïde et la neuroinflammation associée, et permet la restauration de la mémoire dans le modèle APP/PS1. L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que nous avons une molécule efficace sur la pathologie amyloïde mais aussi sur la pathologie Tau *in vivo*. D'autres recherches seront nécessaires pour élucider le mécanisme moléculaire précis d'action de ces molécules et trouver leur cible.

Ces résultats rejoignent ceux d'études précédentes du laboratoire, où des molécules dérivées du même pharmacophore étaient efficaces dans un paradigme préventif contre les pathologies amyloïde et Tau. Il a été démontré qu'un composé contenant le même pharmacophore qui était fusionné à une structure de tacrine, le RPEL, réduisait à la fois la pathologie amyloïde chez les animaux transgéniques APP/PS1 et la pathologie Tau dans le modèle de dégénérescence neurofibrillaire THY-Tau22 (Sergeant et al., 2019). Ces effets ont également été associés à une

amélioration cognitive, cependant ces résultats ont été obtenus dans un paradigme préventif puisque les animaux ont été traités à partir de l'âge de 3 mois avant l'apparition des lésions dans les deux modèles transgéniques. Cette étude montrait également que la modulation de la γ -secrétase qui est acheminée vers les endosomes précoces avec la β -secrétase ne contribue probablement pas à l'effet observé de nos composés puisque le clivage de Notch1, un substrat de la γ -secrétase n'est pas modifié par RPEL, MAGS ou PEL (Gay et al., 2018b; Sergeant et al., 2019). Ces résultats rejoignent un article publié récemment où il est montré que l'AZP2006, un composé en phase d'essai clinique 2, possédait des effets neuroprotecteurs dans les neurones lésés par l'injection de peptides A β 1-42 et sur la pathologie amyloïde et Tau dans deux modèles animaux de la MA et du vieillissement (Callizot et al., 2021). Ainsi, un traitement préventif chronique avec AZP2006 a permis de réduire la perte synaptique et neuronale, et de diminuer la neuroinflammation massive associée à la pathologie Alzheimer.

Après deux décennies d'efforts infructueux de développement de médicaments portant sur l'un des mécanismes pathologiques, comme la pathologie Tau, la pathologie amyloïde, le stress oxydatif, les déficits cholinergiques ou autres neurotransmetteurs, ou encore la dyshoméostasie biométallique (Yang et al., 2019), il devient de plus en plus évident que la façon la plus réaliste de faire face à cette maladie multifactorielle complexe impliquerait le développement de médicaments multi-actions ou multi-cibles ou une combinaison de médicaments qui permettent la modulation simultanée de plusieurs cibles clés ou événements pathologiques de la MA. Nous avons montré que notre molécule PEL est une molécule multi-action qui possède une seule activité essentielle, la modulation de la β -secrétase, qui lui permet d'avoir un effet sur les trois composantes principales de la maladie d'Alzheimer que sont la pathologie Tau, la pathologie amyloïde et l'inflammation. Les résultats de cette étude démontrent un potentiel prometteur des petites molécules dans le cadre d'une stratégie d'intervention pharmacologique médiée par les astrocytes qui pourrait améliorer les déficits de la MA même après l'apparition de la phase symptomatique de la maladie. En effet, la conception de composés multicibles, principalement par hybridation de différents pharmacophores, a connu une croissance exponentielle au cours des quinze dernières années et fait l'objet de recherche très intensive (Pont et al., 2021). Ainsi, connaître l'activité importante pour l'obtention des effets désirés *in vivo* est essentiel pour orienter le développement des futures molécules, et cette activité peut être dépendante d'aussi peu qu'un seul atome d'azote de différence. Il est donc important de développer des molécules capables d'avoir plusieurs cibles et d'agir à la fois sur A β et sur Tau, ce qui est encore minoritaire dans les essais cliniques. Néanmoins, prédire l'issue des essais cliniques est rendu

difficile par le manque de réponses concluantes à plusieurs questions clés. Les formes les plus pathogènes d'Aβ semblent être les oligomères, alors quelle est la contribution des plaques dans la maladie, bénéfiques par la rétention des peptides Aβ ou délétères et toxiques ? Et les formes les plus pathogènes de Tau sont-elles des monomères, des multimères mal repliés, sont-elles fibrillaires ou non fibrillaires ? Ces espèces de Tau pathogènes agissent-elles de manière intracellulaire ou extracellulaire ? La propagation de cellule à cellule de Tau altère-t-elle la survie neuronale ou les fonctions cérébrales ? Quels sont les mécanismes en aval les plus percutants qui perturbent l'équilibre du peptide amyloïde au cours du développement et de la progression de la maladie d'Alzheimer sporadique ? Pourraient-ils être bloqués sans effets secondaires importants ?

Cette étude comporte un certain nombre de limitations, incluant le fait que nous aurions pu tester nos molécules sur d'autres modèles lésionnels de la maladie d'Alzheimer. Notamment, un modèle multilésionnel tels que le 3xTg (Oddo et al., 2003), qui porte une triple mutation sur les gènes de l'*APP*, *PSEN* et *MAPT* aurait été un modèle intéressant pour étudier l'effet de PEL sur la synergie des deux lésions amyloïde et Tau simultanément. Cependant nous avons choisi d'utiliser deux modèles présentant chacun une lésion de la MA, car ce triple modèle ne montre pas forcément d'interactions entre Tau et l'amyloïde, et développe les lésions amyloïdes et Tau en décalé, avec une apparition de plaques vers 6 mois et une apparition de la DNF plus tardive, vers 12 mois. De plus, le fait d'avoir utilisé deux modèles lésionnels séparés nous a permis de mettre en évidence que PEL a entraîné une diminution de l'astrogliose dans chacun des modèles et de confirmer que c'était une composante de premier plan qui était systématiquement modifiée par notre molécule, et donc qui jouerait sûrement un rôle pivot dans son action bénéfique sur les lésions. Les SAMP8, SAMP10 (Takeda, 2009; Morley et al., 2012; Pallàs, 2012) ou encore d'autres modèles de vieillissement auraient également été utiles pour approfondir l'étude et évaluer si les perturbations de l'immunité liées à l'âge étaient susceptibles d'être inversées par un traitement avec PEL.

L'aspect le plus critique de cette étude est sans doute l'utilisation de modèles murins pour refléter la MA telle qu'elle se déroule chez l'humain. Une grande partie de nos connaissances sur la physiopathologie des peptides Aβ dérive de modèles murins transgéniques avec des mutations humanisées, ces modèles étant de plus en plus remis en question quant à savoir s'ils peuvent ou non représenter des modèles adéquats de la pathologie Alzheimer humaine (Ricciarelli and Fedeles, 2017; Sasaguri et al., 2017). Du fait que ces souris portent les mutations

retrouvées dans la MA familiale, il est évident qu'elles ne sont pas représentatives de l'apparition tardive de la MA sporadique, qui représente plus de 95% des cas de MA. Bien que les deux formes de MA présentent des caractéristiques anatomo-pathologiques similaires, il est bien connu qu'elles se manifestent à des âges différents et avec une progression de la maladie qui diffère également. La plupart de ces modèles de rongeurs sont donc basés sur la séquence APP humaine, synthétisée à partir de mini-gènes artificiels insérés aléatoirement dans le génome du rongeur. Bien que ces modèles imitent assez bien divers aspects biochimiques de la maladie, tels que l'agrégation A β , ils sont également sujets à des artéfacts potentiels causés par la surexpression de l'APP (par exemple la dysrégulation de la neurotransmission GABAergique (Rice et al., 2019)) et à des altérations phénotypiques complexes, en raison de l'intégration aléatoire des transgènes, qui pourrait avoir un impact sur l'expression correcte des gènes adjacents (Goodwin et al., 2019; Serneels et al., 2020).

Même en ce qui concerne la MA familiale, les modèles transgéniques APP comme les APP/PS1 présentent plusieurs inconvénients puisqu'ils ne montrent pas d'enchevêtrements neurofibrillaires et que la mort neuronale est pratiquement absente chez ces souris. De plus, le fait que les oligomères A β soient connus comme étant toxiques pour les neurones *in vitro* (Kim et al., 2003) et que la mort cellulaire soit quasiment absente dans les APP/PS1 ne peut que conduire à la conclusion que les peptides A β seuls ne peuvent pas déclencher de neurodégénérescence *in vivo*, et/ou que les événements moléculaires et cellulaires en amont et en aval de la formation de plaque amyloïde chez les humains sont absents chez les rongeurs. Le vieillissement pourrait être un élément contributif majeur, car la génération de plaques amyloïdes chez les humains s'étend sur plusieurs décennies. De plus, il est de plus en plus reconnu que la transition du début de l'agrégation des peptides A β à la MA implique des boucles de rétroaction complexes entre les cellules gliales et les plaques amyloïdes, qui pourraient n'être que partiellement imitées dans le cerveau des rongeurs (De Strooper and Karran, 2016). Il manque également aux modèles APP/PS1 et THY-Tau22, ainsi qu'à la plupart des modèles murins, une composante de transmission de type prions de chacune des lésions, qui n'est pas reproduite dans ce système. C'est donc une autre limite de cette étude de n'avoir aucune information sur une potentielle action des molécules sur la transmission inter-neuronale des lésions dans un modèle de transmissibilité.

Dans les perspectives de cette étude, nous pourrions inclure la recherche de la cible moléculaire de nos molécules, qui pourrait être également multiple. PEL pourrait avoir une cible dans les endosomes, ou posséder un effet sur le pH de certains compartiments sans nuire au flux

autophagie malgré cela. Un changement de pH de certains compartiments par PEL serait susceptible de changer la capacité catalytique de la β -secrétase, qui a une activité optimale à pH acide (Vassar et al., 1999), sans perturber le flux autophagique. Il serait possible de vérifier si PEL altère le pH lysosomal grâce à un LysoTracker et/ou LysoSensor. Il se pourrait également que PEL altère l'adressage de l'APP et/ou de BACE1 aux endosomes, peut-être via une interaction avec la protéine GGA1, que nous avons retrouvée en plus forte quantité dans le cortex des souris APP/PS1. PEL pourrait également agir sur la machinerie enzymatique qui élimine les espèces amyloïdes, nous pourrions pour vérifier cette hypothèse évaluer l'expression et la synthèse de l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) et de la néprilysine (NEP), deux des enzymes de dégradation de l'amyloïde les plus importantes (Farris et al., 2003; Grimm et al., 2013). Une autre idée intéressante serait que PEL inhibe l'AEP (la δ -secrétase) qui en clivant l'APP en fait un meilleur substrat pour la β -secrétase et donc cela diminuerait les fragments A β . De plus, au cours du vieillissement cérébral, l'activation enzymatique de la protéase de l'AEP est favorisée et elle est transférée des endolysosomes jusque dans l'espace cytoplasmique, où elle est capable de cliver Tau, résultant en l'obtention de fragments neurotoxiques tronqués, d'une hyperphosphorylation de Tau et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires. En outre, l'AEP clive SET (SE translocation), conduisant à l'inhibition de PP2A (Zhang et al., 2015). Afin d'investiguer plus précisément les effets de PEL, une cinétique de traitement pourrait permettre de savoir si l'action sur l'astrogliose précède l'action sur les dépôts amyloïdes. Une étude sur un modèle murin d'inflammation, comme des modèles de sclérose en plaque, pourrait également être intéressante pour un éventuel repositionnement de PEL en tant que molécule anti-inflammatoire.

Bibliographie

- Abdul-Hay, S. O., Sahara, T., McBride, M., Kang, D., and Leissring, M. A. (2012). Identification of BACE2 as an avid β -amyloid-degrading protease. *Mol. Neurodegener.* 7, 46. doi:10.1186/1750-1326-7-46.
- Abisambra, J. F., Jinwal, U. K., Blair, L. J., O’Leary, J. C., Li, Q., Brady, S., et al. (2013). Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 9498–9507. doi:10.1523/JNEUROSCI.5397-12.2013.
- Abolhassani, N., Leon, J., Sheng, Z., Oka, S., Hamasaki, H., Iwaki, T., et al. (2017). Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer’s disease brain. *Mech. Ageing Dev.* 161, 95–104. doi:10.1016/j.mad.2016.05.005.
- Abounit, S., Wu, J. W., Duff, K., Victoria, G. S., and Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes: A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion* 10, 344–351. doi:10.1080/19336896.2016.1223003.
- Agadjanyan, M. G., Zagorski, K., Petrushina, I., Davtyan, H., Kazarian, K., Antonenko, M., et al. (2017). Humanized monoclonal antibody armanezumab specific to N-terminus of pathological tau: characterization and therapeutic potency. *Mol. Neurodegener.* 12, 33. doi:10.1186/s13024-017-0172-1.
- Agholme, L., Hallbeck, M., Benedikz, E., Marcusson, J., and Kågedal, K. (2012). Amyloid- β secretion, generation, and lysosomal sequestration in response to proteasome inhibition: involvement of autophagy. *J. Alzheimers Dis. JAD* 31, 343–358. doi:10.3233/JAD-2012-120001.
- Ahmed, R., Akcan, M., Khondker, A., Rheinstädter, M. C., Bozelli, J. C., Epand, R. M., et al. (2019). Atomic resolution map of the soluble amyloid beta assembly toxic surfaces. *Chem. Sci.* 10, 6072–6082. doi:10.1039/c9sc01331h.
- Ahmed, T., Blum, D., Burnouf, S., Demeyer, D., Buée-Scherrer, V., D’Hooge, R., et al. (2015). Rescue of impaired late-phase long-term depression in a tau transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 36, 730–739. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.015.
- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Caillierez, R., Buée, L., Blum, D., D’Hooge, R., et al. (2020). Chronic Sodium Selenate Treatment Restores Deficits in Cognition and Synaptic Plasticity in a Murine Model of Tauopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 570223. doi:10.3389/fnmol.2020.570223.

- Aizenstein, H. J., Nebes, R. D., Saxton, J. A., Price, J. C., Mathis, C. A., Tsopelas, N. D., et al. (2008). Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch. Neurol.* 65, 1509–1517. doi:10.1001/archneur.65.11.1509.
- Alagiakrishnan, K., McCracken, P., and Feldman, H. (2006). Treating vascular risk factors and maintaining vascular health: is this the way towards successful cognitive ageing and preventing cognitive decline? *Postgrad. Med. J.* 82, 101–105. doi:10.1136/pgmj.2005.035030.
- Al-Bari, M. A. A. (2015). Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1608–1621. doi:10.1093/jac/dkv018.
- Albert, M., Mairet-Coello, G., Danis, C., Lieger, S., Caillierez, R., Carrier, S., et al. (2019). Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain* 142, 1736–1750. doi:10.1093/brain/awz100.
- Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2, 783–787. doi:10.1038/nm0796-783.
- Alonso, A. del C., Li, B., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2006). Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8864–8869. doi:10.1073/pnas.0603214103.
- Alzheimer's Association (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 12, 459–509. doi:10.1016/j.jalz.2016.03.001.
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., et al. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–200. doi:10.1038/nature17623.
- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1739, 91–103. doi:10.1016/j.bbadis.2004.08.010.
- Andrew, R. J., Kellett, K. A. B., Thinakaran, G., and Hooper, N. M. (2016). A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J. Biol. Chem.* 291, 19235–19244. doi:10.1074/jbc.R116.746032.

- Andrews-Zwilling, Y., Bien-Ly, N., Xu, Q., Li, G., Bernardo, A., Yoon, S. Y., et al. (2010). Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 13707–13717. doi:10.1523/JNEUROSCI.4040-10.2010.
- Araki, W., Kitaguchi, N., Tokushima, Y., Ishii, K., Aratake, H., Shimohama, S., et al. (1991). Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 265–271. doi:10.1016/s0006-291x(05)81412-3.
- Arendt, T., Stieler, J. T., and Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* 126, 238–292. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.018.
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593. doi:10.1038/nn.4132.
- Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., et al. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 231–235. doi:10.1016/S0006-291X(02)02999-6.
- Ashfaq, U. A., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z., and Riazuddin, S. (2011). Lysosomotropic agents as HCV entry inhibitors. *Virology* 438, 163. doi:10.1016/j.virol.2011.08.016.
- Ashton, N. J., Hye, A., Rajkumar, A. P., Leuzy, A., Snowden, S., Suárez-Calvet, M., et al. (2020). An update on blood-based biomarkers for non-Alzheimer neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 16, 265–284. doi:10.1038/s41582-020-0348-0.
- Asuni, A. A., Boutajangout, A., Quartermain, D., and Sigurdsson, E. M. (2007). Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements. *J. Neurosci.* 27, 9115–9129. doi:10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007.
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., and Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 26–35. doi:10.1007/s004010100423.
- Babu, J. R., Geetha, T., and Wooten, M. W. (2005). Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* 94, 192–203. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03181.x.
- Baker, M., Mackenzie, I. R., Pickering-Brown, S. M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., et al. (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442, 916–919. doi:10.1038/nature05016.

- Bannas, P., Hambach, J., and Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front. Immunol.* 8, 1603. doi:10.3389/fimmu.2017.01603.
- Baranello, R. J., Bharani, K. L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D. K., Greig, N. H., et al. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 32–46. doi:10.2174/1567205012666141218140953.
- Baranger, K., Bonnet, A. E., Girard, S. D., Paumier, J.-M., García-González, L., Elmanaa, W., et al. (2016a). MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in vitro. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 163. doi:10.3389/fnmol.2016.00163.
- Baranger, K., Marchalant, Y., Bonnet, A. E., Crouzin, N., Carrete, A., Paumier, J.-M., et al. (2016b). MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 217–236. doi:10.1007/s00018-015-1992-1.
- Barão, S., Moechars, D., Lichtenthaler, S. F., and De Strooper, B. (2016). BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* 39, 158–169. doi:10.1016/j.tins.2016.01.003.
- Barbosa, M. C., Grosso, R. A., and Fader, C. M. (2018). Hallmarks of Aging: An Autophagic Perspective. *Front. Endocrinol.* 9, 790. doi:10.3389/fendo.2018.00790.
- Barger, S. W., and Harmon, A. D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388, 878–881. doi:10.1038/42257.
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 74–104. doi:10.1037/h0077579.
- Barnes, N. Y., Li, L., Yoshikawa, K., Schwartz, L. M., Oppenheim, R. W., and Milligan, C. E. (1998). Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 5869–5880.
- Barrera Ocampo, A., and Lopera, F. (2016). Amyloid-beta immunotherapy: the hope for Alzheimer disease? *Colomb. Medica*, 203–212. doi:10.25100/cm.v47i4.2640.
- Barthélemy, N. R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B. A., Hassenstab, J., Benzinger, Tammie. L. S., et al. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26, 398–407. doi:10.1038/s41591-020-0781-z.

- Bate, C., and Williams, A. (2010). Amyloid- β (1-40) inhibits amyloid- β (1-42) induced activation of cytoplasmic phospholipase A2 and synapse degeneration. *J. Alzheimers Dis. JAD* 21, 985–993. doi:10.3233/JAD-2010-100528.
- Bates, K. A., Verdile, G., Li, Q.-X., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. L., et al. (2009). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid- β peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol. Psychiatry* 14, 469–486. doi:10.1038/mp.2008.96.
- Becker-Pauly, C., and Pietrzik, C. U. (2016). The Metalloprotease Meprin β Is an Alternative β -Secretase of APP. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 159. doi:10.3389/fnmol.2016.00159.
- Bejanin, A., Schonhaut, D. R., La Joie, R., Kramer, J. H., Baker, S. L., Sosa, N., et al. (2017). Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 140, 3286–3300. doi:10.1093/brain/awx243.
- Ben Halima, S., Mishra, S., Raja, K. M. P., Willem, M., Baici, A., Simons, K., et al. (2016). Specific Inhibition of β -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Rep.* 14, 2127–2141. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.076.
- Ben Khalifa, N., Tyteca, D., Courtoy, P. J., Renauld, J. C., Constantinescu, S. N., Octave, J. N., et al. (2012a). Contribution of Kunitz Protease Inhibitor and Transmembrane Domains to Amyloid Precursor Protein Homodimerization. *Neurodegener. Dis.* 10, 92–95. doi:10.1159/000335225.
- Ben Khalifa, N., Tyteca, D., Marinangeli, C., Depuydt, M., Collet, J.-F., Courtoy, P. J., et al. (2012b). Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 855–867. doi:10.1096/fj.11-190207.
- Bence, N. F., Sampat, R. M., and Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552–1555. doi:10.1126/science.292.5521.1552.
- Bendiske, J., and Bahr, B. A. (2003). Lysosomal Activation Is a Compensatory Response Against Protein Accumulation and Associated Synaptopathogenesis—An Approach for Slowing Alzheimer Disease? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 451–463. doi:10.1093/jnen/62.5.451.
- Bennett, R. E., DeVos, S. L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., et al. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *Am. J. Pathol.* 187, 1601–1612. doi:10.1016/j.ajpath.2017.03.011.
- Berger-Sweeney, J., McPhie, D. L., Arters, J. A., Greenan, J., Oster-Granite, M. L., and Neve, R. L. (1999). Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-

- terminus of the amyloid precursor protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 66, 150–162. doi:10.1016/s0169-328x(99)00014-5.
- Bertrand, E., Brouillet, E., Caillé, I., Bouilliot, C., Cole, G. M., Prochiantz, A., et al. (2001). A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* 18, 503–511. doi:10.1006/mcne.2001.1030.
- Bien, J., Jefferson, T., Causević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., et al. (2012). The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. *J. Biol. Chem.* 287, 33304–33313. doi:10.1074/jbc.M112.395608.
- Bierer, L. M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P. J., Carlin, L. S., Purohit, D. P., et al. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* 64, 749–760. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64020749.x.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153–163. doi:10.1016/0896-6273(93)90279-z.
- Binder, L. I., Frankfurter, A., and Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371–1378. doi:10.1083/jcb.101.4.1371.
- Biswas, S., and Kalil, K. (2018). The Microtubule-Associated Protein Tau Mediates the Organization of Microtubules and Their Dynamic Exploration of Actin-Rich Lamellipodia and Filopodia of Cortical Growth Cones. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 291–307. doi:10.1523/JNEUROSCI.2281-17.2017.
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., and Teplow, D. B. (2003). Amyloid beta-protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 330–335. doi:10.1073/pnas.222681699.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., et al. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 80, 6964–6972. doi:10.1128/JVI.00024-06.
- Blennow, K., Wallin, A., Agren, H., Spenger, C., Siegfried, J., and Vanmechelen, E. (1995). Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26, 231–245. doi:10.1007/BF02815140.
- Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. *JAMA Neurol.* 71, 505. doi:10.1001/jamaneurol.2013.5847.

- Bohrmann, B., Baumann, K., Benz, J., Gerber, F., Huber, W., Knoflach, F., et al. (2012). Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J. Alzheimers Dis. JAD* 28, 49–69. doi:10.3233/JAD-2011-110977.
- Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzog, M. C., Radde, R., Staufenbiel, M., et al. (2007). Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171, 2012–2020. doi:10.2353/ajpath.2007.070403.
- Bolós, M., Hu, Y., Young, K. M., Foa, L., and Small, D. H. (2014). Neurogenin 2 Mediates Amyloid- β Precursor Protein-stimulated Neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 289, 31253–31261. doi:10.1074/jbc.M114.581918.
- Bolós, M., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Hernández, F., Rábano, A., and Avila, J. (2016). Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo. *J. Alzheimers Dis. JAD* 50, 77–87. doi:10.3233/JAD-150704.
- Bolós, M., Llorens-Martín, M., Perea, J. R., Jurado-Arjona, J., Rábano, A., Hernández, F., et al. (2017). Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol. Neurodegener.* 12, 59. doi:10.1186/s13024-017-0200-1.
- Bonnet, B., Soulle, D., Girault, S., Maes, L., Landry, V., Davioud-Charvet, E., et al. (2000). Trypanothione reductase inhibition/trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 95–103. doi:10.1016/s0968-0896(99)00268-0.
- Borgaonkar, D. S., Schmidt, L. C., Martin, S. E., Kanzer, M. D., Edelson, L., Growdon, J., et al. (1993). Linkage of late-onset Alzheimer's disease with apolipoprotein E type 4 on chromosome 19. *Lancet Lond. Engl.* 342, 625. doi:10.1016/0140-6736(93)91458-x.
- Bourdenx, M., Koulakiotis, N. S., Sanoudou, D., Bezard, E., Dehay, B., and Tsarbopoulos, A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Prog. Neurobiol.* 155, 171–193. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.07.003.
- Bourdenx, M., Martín-Segura, A., Scrivo, A., Rodríguez-Navarro, J. A., Kaushik, S., Tasset, I., et al. (2021). Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome. *Cell*, S0092867421003792. doi:10.1016/j.cell.2021.03.048.
- Boutajangout, A., Ingadottir, J., Davies, P., and Sigurdsson, E. M. (2011). Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from

- the brain: Clearance of pathological tau by passive immunization. *J. Neurochem.* 118, 658–667. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07337.x.
- Bouvier, D. S., Jones, E. V., Quesseveur, G., Davoli, M. A., A Ferreira, T., Quirion, R., et al. (2016). High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* 6, 24544. doi:10.1038/srep24544.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239–259. doi:10.1007/BF00308809.
- Brandt, R., and Lee, G. (1993). Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 3414–3419.
- Brecht, W. J., Harris, F. M., Chang, S., Tesseur, I., Yu, G.-Q., Xu, Q., et al. (2004). Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2527–2534. doi:10.1523/JNEUROSCI.4315-03.2004.
- Bright, J., Hussain, S., Dang, V., Wright, S., Cooper, B., Byun, T., et al. (2015). Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol. Aging* 36, 693–709. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.007.
- Brion, J. P., Couck, A. M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 89–96.
- Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Shannon, B. J., LaRossa, G., Sachs, R., Fotenos, A. F., et al. (2005). Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7709–7717. doi:10.1523/JNEUROSCI.2177-05.2005.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130. doi:10.1016/s0165-0173(00)00019-9.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.*, 36.
- Buggia-Prévo, V., Fernandez, C. G., Udayar, V., Vetrivel, K. S., Elie, A., Roseman, J., et al. (2013). A function for EHD family proteins in unidirectional retrograde dendritic transport of BACE1 and Alzheimer's disease A β production. *Cell Rep.* 5, 1552–1563. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.006.

- Bugiani, O., Giaccone, G., Rossi, G., Mangieri, M., Capobianco, R., Morbin, M., et al. (2010). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Arch. Neurol.* 67, 987–995. doi:10.1001/archneurol.2010.178.
- Bukhari, H., Glotzbach, A., Kolbe, K., Leonhardt, G., Loosse, C., and Müller, T. (2017). Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 156, 189–213. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.05.005.
- Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., daSilva, L. L. P., Prabhu, Y., Hurley, J. H., et al. (2010). Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Dev. Cell* 18, 425–436. doi:10.1016/j.devcel.2010.01.015.
- Burslem, G. M., and Crews, C. M. (2020). Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell* 181, 102–114. doi:10.1016/j.cell.2019.11.031.
- Busche, M. A., and Hyman, B. T. (2020). Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 23, 1183–1193. doi:10.1038/s41593-020-0687-6.
- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., and Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578–582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y.
- Butterfield, D. A., and Sultana, R. (2011). Methionine-35 of $\alpha\beta$ (1-42): importance for oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Amino Acids* 2011, 198430. doi:10.4061/2011/198430.
- Caballero, B., Wang, Y., Diaz, A., Tasset, I., Juste, Y. R., Stiller, B., et al. (2018). Interplay of pathogenic forms of human tau with different autophagic pathways. *Aging Cell* 17. doi:10.1111/accel.12692.
- Cabezas-Opazo, F. A., Vergara-Pulgar, K., Pérez, M. J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C., and Quintanilla, R. A. (2015). Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–12. doi:10.1155/2015/509654.
- Caceres, A., and Kosik, K. S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461–463. doi:10.1038/343461a0.
- Cai, J., Qi, X., Kociok, N., Skosyrski, S., Emilio, A., Ruan, Q., et al. (2012). β -Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. *EMBO Mol. Med.* 4, 980–991. doi:10.1002/emmm.201101084.

- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., et al. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Dev. Camb. Engl.* 131, 2173–2181. doi:10.1242/dev.01103.
- Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N., and Lefebvre, B. (2015). Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.* 10, 28. doi:10.1186/s13024-015-0025-8.
- Callizot, N., Estrella, C., Burlet, S., Henriques, A., Brantis, C., Barrier, M., et al. (2021). AZP2006, a new promising treatment for Alzheimer's and related diseases. *Sci. Rep.* 11, 16806. doi:10.1038/s41598-021-94708-1.
- Campion, D., Flaman, J. M., Brice, A., Hannequin, D., Dubois, B., Martin, C., et al. (1995). Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2373–2377. doi:10.1093/hmg/4.12.2373.
- Campos-Pea, V., Gmez, R., and Antonio, M. (2014). "Genetics of Alzheimer'S Disease," in *Neurochemistry*, ed. T. Heinbockel (InTech). doi:10.5772/58286.
- Cao, X., and Südhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120. doi:10.1126/science.1058783.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., et al. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275, 30849–30854. doi:10.1074/jbc.M003202200.
- Caporaso, G. L., Gandy, S. E., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (1992). Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2252–2256. doi:10.1073/pnas.89.6.2252.
- Carosi, J. M., Hein, L. K., van den Hurk, M., Adams, R., Milky, B., Singh, S., et al. (2020). Retromer regulates the lysosomal clearance of MAPT/tau. *Autophagy*, 1–21. doi:10.1080/15548627.2020.1821545.
- Carroll, C. M., and Li, Y.-M. (2016). Physiological and pathological roles of the γ -secretase complex. *Brain Res. Bull.* 126, 199–206. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.04.019.
- Carvalho, K., Faivre, E., Pietrowski, M. J., Marques, X., Gomez-Murcia, V., Deleau, A., et al. (2019). Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in tau pathology linked to neuronal adenosine A2A receptor. *Brain* 142, 3636–3654. doi:10.1093/brain/awz288.
- Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., Gerson, J. E., Singh, G., et al. (2014). Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes

- without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles. *J. Neurosci.* 34, 4260–4272. doi:10.1523/JNEUROSCI.3192-13.2014.
- Cecarini, V., Bonfili, L., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Rossi, G., Buizza, L., et al. (2012). Crosstalk between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in a human cellular model of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1741–1751. doi:10.1016/j.bbadis.2012.07.015.
- Cedarbaum, J. M., Jaros, M., Hernandez, C., Coley, N., Andrieu, S., Grundman, M., et al. (2013). Rationale for use of the Clinical Dementia Rating Sum of Boxes as a primary outcome measure for Alzheimer's disease clinical trials. *Alzheimers Dement.* 9, S45–S55. doi:10.1016/j.jalz.2011.11.002.
- Chai, X., Dage, J. L., and Citron, M. (2012). Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol. Dis.* 48, 356–366. doi:10.1016/j.nbd.2012.05.021.
- Chai, X., Wu, S., Murray, T. K., Kinley, R., Cella, C. V., Sims, H., et al. (2011). Passive Immunization with Anti-Tau Antibodies in Two Transgenic Models. *J. Biol. Chem.* 286, 34457–34467. doi:10.1074/jbc.M111.229633.
- Chandra, A., Dervenoulas, G., and Politis, M. (2019). Magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J. Neurol.* 266, 1293–1302. doi:10.1007/s00415-018-9016-3.
- Chang, C.-W., Shao, E., and Mucke, L. (2021). Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies. *Science* 371, eabb8255. doi:10.1126/science.abb8255.
- Chang, K.-A., Kim, H.-S., Ha, T.-Y., Ha, J.-W., Shin, K. Y., Jeong, Y. H., et al. (2006). Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 Regulates the Nuclear Translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration. *MOL CELL BIOL* 26, 12.
- Charlwood, J., Bryant, D., Skehel, J. M., and Camilleri, P. (2001). Analysis of N-linked oligosaccharides: progress towards the characterisation of glycoprotein-linked carbohydrates. *Biomol. Eng.* 18, 229–240. doi:10.1016/s1389-0344(01)00098-3.
- Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., et al. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353, 844–846. doi:10.1038/353844a0.
- Chasseigneaux, S., and Allinquant, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences: A β and sAPPs functions. *J. Neurochem.* 120, 99–108. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x.
- Chasseigneaux, S., Dinc, L., Rose, C., Chabret, C., Couplier, F., Topilko, P., et al. (2011). Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One* 6, e16301. doi:10.1371/journal.pone.0016301.

- Chatterjee, P., Pedrini, S., Stoops, E., Goozee, K., Villemagne, V. L., Asih, P. R., et al. (2021). Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* 11, 27. doi:10.1038/s41398-020-01137-1.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–677. doi:10.1038/360674a0.
- Chen, Y., and Dong, C. (2009). Abeta40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ.* 16, 386–394. doi:10.1038/cdd.2008.94.
- Cheng, Y., and Bai, F. (2018). The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12, 163. doi:10.3389/fnins.2018.00163.
- Chesser, A. S., Pritchard, S. M., and Johnson, G. V. W. (2013). Tau Clearance Mechanisms and Their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Front. Neurol.* 4. doi:10.3389/fneur.2013.00122.
- Chia, P. Z. C., Toh, W. H., Sharples, R., Gasnereau, I., Hill, A. F., and Gleeson, P. A. (2013). Intracellular itinerary of internalised β -secretase, BACE1, and its potential impact on β -amyloid peptide biogenesis. *Traffic Cph. Den.* 14, 997–1013. doi:10.1111/tra.12088.
- Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., and Quintanilla-Vega, B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 124. doi:10.3389/fncel.2015.00124.
- Choi, J. H. K., Kaur, G., Mazzella, M. J., Morales-Corraliza, J., Levy, E., and Mathews, P. M. (2013). Early endosomal abnormalities and cholinergic neuron degeneration in amyloid- β protein precursor transgenic mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* 34, 691–700. doi:10.3233/JAD-122143.
- Chung, K. M., Hernández, N., Sproul, A. A., and Yu, W. H. (2019). Alzheimer's disease and the autophagic-lysosomal system. *Neurosci. Lett.* 697, 49–58. doi:10.1016/j.neulet.2018.05.017.
- Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., and Stevens, B. (2015). Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat. Neurosci.* 18, 1539–1545. doi:10.1038/nn.4142.
- Ciechanover, A., and Kwon, Y. T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* 47, e147. doi:10.1038/emm.2014.117.
- Cieplak, A. S. (2019). Tau Inclusions in Alzheimer's, Chronic Traumatic Encephalopathy and Pick's Disease. A Speculation on How Differences in Backbone Polarization Underlie Divergent Pathways of Tau Aggregation. *Front. Neurosci.* 13, 488. doi:10.3389/fnins.2019.00488.

- Cieri, D., Vicario, M., Vallese, F., D'Orsi, B., Berto, P., Grinzato, A., et al. (2018). Tau localises within mitochondrial sub-compartments and its caspase cleavage affects ER-mitochondria interactions and cellular Ca²⁺ handling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1864, 3247–3256. doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.011.
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., and Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 32, 275–279. doi:10.1007/s10072-010-0454-7.
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., et al. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48, 913–922. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.028.
- Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D. B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., et al. (1994). Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11993–11997. doi:10.1073/pnas.91.25.11993.
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R. A., Frank, S., Hench, J., et al. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9535–9540. doi:10.1073/pnas.1301175110.
- Clavaguera, F., Grueninger, F., and Tolnay, M. (2014). Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 9–15. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.037.
- Clayton, K., Delpech, J. C., Herron, S., Iwahara, N., Ericsson, M., Saito, T., et al. (2021). Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model. *Mol. Neurodegener.* 16, 18. doi:10.1186/s13024-021-00440-9.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., et al. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79–84. doi:10.1038/nn1372.
- Cohen, A. D., Price, J. C., Weissfeld, L. A., James, J., Rosario, B. L., Bi, W., et al. (2009). Basal cerebral metabolism may modulate the cognitive effects of Abeta in mild cognitive impairment: an example of brain reserve. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 14770–14778. doi:10.1523/JNEUROSCI.3669-09.2009.
- Cohen, M. L., Kim, C., Haldiman, T., ElHag, M., Mehndiratta, P., Pichet, T., et al. (2015). Rapidly progressive Alzheimer's disease features distinct structures of amyloid- β . *Brain J. Neurol.* 138, 1009–1022. doi:10.1093/brain/awv006.

- Colombo, F., and Meldolesi, J. (2015). L1-CAM and N-CAM: From Adhesion Proteins to Pharmacological Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 769–781. doi:10.1016/j.tips.2015.08.004.
- Congdon, E. E., and Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 399–415. doi:10.1038/s41582-018-0013-z.
- Congdon, E. E., Wu, J. W., Myeku, N., Figueroa, Y. H., Herman, M., Marinec, P. S., et al. (2012). Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy* 8, 609–622. doi:10.4161/auto.19048.
- Contino, S., Porporato, P. E., Bird, M., Marinangeli, C., Opsomer, R., Sonveaux, P., et al. (2017). Presenilin 2-Dependent Maintenance of Mitochondrial Oxidative Capacity and Morphology. *Front. Physiol.* 8, 796. doi:10.3389/fphys.2017.00796.
- Coric, V., Salloway, S., van Dyck, C. H., Dubois, B., Andreasen, N., Brody, M., et al. (2015). Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 72, 1324. doi:10.1001/jamaneurol.2015.0607.
- Correia, S. C., Resende, R., Moreira, P. I., and Pereira, C. M. (2015). Alzheimer's disease-related misfolded proteins and dysfunctional organelles on autophagy menu. *DNA Cell Biol.* 34, 261–273. doi:10.1089/dna.2014.2757.
- Corti, O., Blomgren, K., Poletti, A., and Beart, P. M. (2020). Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases. *J. Neurochem.* 154, 354–371. doi:10.1111/jnc.15002.
- Cowan, C. M., and Mudher, A. (2013). Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front. Neurol.* 4, 114. doi:10.3389/fneur.2013.00114.
- Creemers, J. W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., et al. (2001). Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J. Biol. Chem.* 276, 4211–4217. doi:10.1074/jbc.M006947200.
- Crotti, A., and Ransohoff, R. M. (2016). Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity* 44, 505–515. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.013.
- Crump, C. J., Castro, S. V., Wang, F., Pozdnyakov, N., Ballard, T. E., Sisodia, S. S., et al. (2012). BMS-708,163 Targets Presenilin and Lacks Notch-Sparing Activity. *Biochemistry* 51, 7209–7211. doi:10.1021/bi301137h.
- Cruz, J. C., Tseng, H.-C., Goldman, J. A., Shih, H., and Tsai, L.-H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40, 471–483. doi:10.1016/s0896-6273(03)00627-5.

- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263, 55–72. doi:10.1023/B:MCBI.0000041848.57020.57.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (2000). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J. Cell Sci.* 113 Pt 24, 4441–4450.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., and Zhong, K. (2020). Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 6. doi:10.1002/trc2.12050.
- d’Orange, M., Aurégan, G., Cheramy, D., Gaudin-Guérif, M., Lieger, S., Guillemier, M., et al. (2018). Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain J. Neurol.* 141, 535–549. doi:10.1093/brain/awx342.
- Dai, C., Chen, X., Kazim, S. F., Liu, F., Gong, C.-X., Grundke-Iqbal, I., et al. (2015). Passive immunization targeting the N-terminal projection domain of tau decreases tau pathology and improves cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease and tauopathies. *J. Neural Transm.* 122, 607–617. doi:10.1007/s00702-014-1315-y.
- Das, U., Scott, D. A., Ganguly, A., Koo, E. H., Tang, Y., and Roy, S. (2013). Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. *Neuron* 79, 447–460. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.035.
- David, D. C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., and Spillantini, M. G. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. *J. Neurochem.* 83, 176–185. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01137.x.
- Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O’Dowd, G., et al. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90, 1–13. doi:10.1016/s0306-4522(98)00410-2.
- De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., Van Hoof, C., Waelkens, E., Merlevede, W., et al. (1999). Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* 38, 16539–16547. doi:10.1021/bi991646a.
- de Leon, M. J., Convit, A., Wolf, O. T., Tarshish, C. Y., DeSanti, S., Rusinek, H., et al. (2001). Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10966–10971. doi:10.1073/pnas.191044198.
- De Santi, S., de Leon, M. J., Rusinek, H., Convit, A., Tarshish, C. Y., Roche, A., et al. (2001). Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiol. Aging* 22, 529–539. doi:10.1016/s0197-4580(01)00230-5.

- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* 90, 465–494. doi:10.1152/physrev.00023.2009.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2010). Novel research horizons for presenilins and γ -secretases in cell biology and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 235–260. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104117.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., et al. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387–390. doi:10.1038/34910.
- Deane, R., and Zlokovic, B. V. (2007). Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 191–197. doi:10.2174/156720507780362245.
- Delacourte, A., and Buée, L. (1989). [Alzheimer's disease: the glial reaction is general and severe in all areas of the central nervous system]. *C. R. Acad. Sci. III* 308, 359–365.
- Delacourte, A., Flament, S., Dibe, E. M., Hublau, P., Sablonnière, B., Hémon, B., et al. (1990). Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. Demonstration with a panel of antibodies against Tau proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 80, 111–117. doi:10.1007/BF00308912.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Wattez, A., Maurage, C.-A., Lebert, F., et al. (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 398–407. doi:10.1212/WNL.59.3.398.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., et al. (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 149, 81–94. doi:10.1083/jcb.149.1.81.
- Derisbourg, M., Leghay, C., Chiappetta, G., Fernandez-Gomez, F.-J., Laurent, C., Demeyer, D., et al. (2015). Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by newendogenous truncated forms. *Sci. Rep.* 5, 9659. doi:10.1038/srep09659.
- Derouesne, C., Poitreneau, J., Hugonot, L., Kalafat, M., Dubois, B., and Laurent, B. (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 Fr.* 1983 28, 1141–1148.
- Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., Chambrud, B., et al. (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 9080–9085. doi:10.1073/pnas.1708448114.

- De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164, 603–615. doi:10.1016/j.cell.2015.12.056.
- DeVos, S. L., Corjuc, B. T., Commins, C., Dujardin, S., Bannon, R. N., Corjuc, D., et al. (2018). Tau reduction in the presence of amyloid- β prevents tau pathology and neuronal death in vivo. *Brain* 141, 2194–2212. doi:10.1093/brain/awy117.
- DeVos, S. L., Goncharoff, D. K., Chen, G., Kebodeaux, C. S., Yamada, K., Stewart, F. R., et al. (2013). Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 12887–12897. doi:10.1523/JNEUROSCI.2107-13.2013.
- DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., et al. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci. Transl. Med.* 9, eaag0481. doi:10.1126/scitranslmed.aag0481.
- Di Scala, C., Yahi, N., Boutemur, S., Flores, A., Rodriguez, L., Chahinian, H., et al. (2016). Common molecular mechanism of amyloid pore formation by Alzheimer's β -amyloid peptide and α -synuclein. *Sci. Rep.* 6, 28781. doi:10.1038/srep28781.
- Dickson, T. C., Saunders, H. L., and Vickers, J. C. (1997). Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 9.
- Dinkel, P. D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., and Margittai, M. (2011). Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry* 50, 4330–4336. doi:10.1021/bi2004685.
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., and Holzbaur, E. L. F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086–1089. doi:10.1126/science.1152993.
- Domert, J., Rao, S. B., Agholme, L., Brorsson, A.-C., Marcusson, J., Hallbeck, M., et al. (2014). Spreading of amyloid- β peptides via neuritic cell-to-cell transfer is dependent on insufficient cellular clearance. *Neurobiol. Dis.* 65, 82–92. doi:10.1016/j.nbd.2013.12.019.
- Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., et al. (2013). A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 369, 341–350. doi:10.1056/NEJMoa1210951.
- Doody, R. S., Raman, R., Sperling, R. A., Seimers, E., Sethuraman, G., Mohs, R., et al. (2015). Peripheral and central effects of γ -secretase inhibition by semagacestat in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 7, 36. doi:10.1186/s13195-015-0121-6.

- dos Santos Pisoni, D., Sobieski da Costa, J., Gamba, D., Petzhold, C. L., de Amorim Borges, A. C., Ceschi, M. A., et al. (2010). Synthesis and AChE inhibitory activity of new chiral tetrahydroacridine analogues from terpenic cyclanones. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 526–535. doi:10.1016/j.ejmech.2009.10.039.
- Dourlen, P., Kilinc, D., Malmanche, N., Chapuis, J., and Lambert, J.-C. (2019). The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 138, 221–236. doi:10.1007/s00401-019-02004-0.
- Drachman, D. A. (2014). The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 10, 372–380. doi:10.1016/j.jalz.2013.11.003.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Döring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., et al. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 11, 2131–2138.
- Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M., and Kirschner, M. W. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell Biol.* 101, 1799–1807. doi:10.1083/jcb.101.5.1799.
- Drummond, E., Pires, G., MacMurray, C., Askenazi, M., Nayak, S., Bourdon, M., et al. (2020). Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. 15.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 6, 734–746. doi:10.1016/S1474-4422(07)70178-3.
- Dudal, S., Krzywkowski, P., Paquette, J., Morissette, C., Lacombe, D., Tremblay, P., et al. (2004). Inflammation occurs early during the Abeta deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiol. Aging* 25, 861–871. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.008.
- Dujardin, S. (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat. Med.*, 36.
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., et al. (2014). Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PloS One* 9, e100760. doi:10.1371/journal.pone.0100760.
- Dupré, E., Danis, C., Arrial, A., Hanouille, X., Homa, M., Cantrelle, F.-X., et al. (2019). Single Domain Antibody Fragments as New Tools for the Detection of Neuronal Tau Protein in Cells and in Mice Studies. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 3997–4006. doi:10.1021/acscchemneuro.9b00217.

- Duyckaerts, C., Bennefib, M., Grignon, Y., Uchiara, T., He, Y., Piette, F., et al. (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol. Aging* 18, 267–273. doi:10.1016/s0197-4580(97)80306-5.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486–488. doi:10.1038/ncb960.
- Eisele, Y. S., Bolmont, T., Heikenwalder, M., Langer, F., Jacobson, L. H., Yan, Z.-X., et al. (2009). Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic Abeta inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12926–12931. doi:10.1073/pnas.0903200106.
- El Kadmiri, N., Hamzi, K., El Moutawakil, B., Slassi, I., and Nadifi, S. (2013). Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer (Revue). *Pathol. Biol.* 61, 228–238. doi:10.1016/j.patbio.2013.04.001.
- Emirandetti, A., Graciele Zanon, R., Sabha, M., and de Oliveira, A. L. R. (2006). Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res.* 1095, 35–42. doi:10.1016/j.brainres.2006.04.021.
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., et al. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/s41593-020-00783-4.
- Esmali-Azad, B., McCarty, J. H., and Feinstein, S. C. (1994). Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 4), 869–879.
- Evrard, C., Kienlen-Campard, P., Coevoet, M., Opsomer, R., Tasiaux, B., Melnyk, P., et al. (2018). Contribution of the Endosomal-Lysosomal and Proteasomal Systems in Amyloid- β Precursor Protein Derived Fragments Processing. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 435. doi:10.3389/fncel.2018.00435.
- Fagiani, F., Lanni, C., Racchi, M., and Govoni, S. (2021). (Dys)regulation of Synaptic Activity and Neurotransmitter Release by β -Amyloid: A Look Beyond Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 635880. doi:10.3389/fnmol.2021.635880.
- Falcon, B., Cavallini, A., Angers, R., Glover, S., Murray, T. K., Barnham, L., et al. (2015). Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J. Biol. Chem.* 290, 1049–1065. doi:10.1074/jbc.M114.589309.
- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, R. C., Woodgett, J. R., and Mills, G. B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11960–11965. doi:10.1073/pnas.220413597.

- Fanutza, T., Del Prete, D., Ford, M. J., Castillo, P. E., and D'Adamio, L. (2015). APP and APLP2 interact with the synaptic release machinery and facilitate transmitter release at hippocampal synapses. *eLife* 4, e09743. doi:10.7554/eLife.09743.
- Farah, C. A., Perreault, S., Liazoghli, D., Desjardins, M., Anton, A., Lauzon, M., et al. (2006). Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 710–724. doi:10.1002/cm.20157.
- Farfel-Becker, T., Roney, J. C., Cheng, X.-T., Li, S., Cuddy, S. R., and Sheng, Z.-H. (2019). Neuronal Soma-Derived Degradative Lysosomes Are Continuously Delivered to Distal Axons to Maintain Local Degradation Capacity. *Cell Rep.* 28, 51–64.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.013.
- Farizatto, K. L. G., Ikonne, U. S., Almeida, M. F., Ferrari, M. F. R., and Bahr, B. A. (2017). Aβ42-mediated proteasome inhibition and associated tau pathology in hippocampus are governed by a lysosomal response involving cathepsin B: Evidence for protective crosstalk between protein clearance pathways. *PloS One* 12, e0182895. doi:10.1371/journal.pone.0182895.
- Farlow, M., Arnold, S. E., van Dyck, C. H., Aisen, P. S., Snider, B. J., Porsteinsson, A. P., et al. (2012). Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 8, 261–271. doi:10.1016/j.jalz.2011.09.224.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., et al. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349–1356.
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., et al. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid -protein, and the -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4162–4167. doi:10.1073/pnas.0230450100.
- Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., et al. (2002). The Neuronal Microtubule-Associated Protein Tau Is a Substrate for Caspase-3 and an Effector of Apoptosis. *J. Neurochem.* 75, 624–633. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750624.x.
- Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P., and Hemmings, B. A. (1994). The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J. Biol. Chem.* 269, 16311–16317.
- Fernandez, M. A., Klutkowski, J. A., Freret, T., and Wolfe, M. S. (2014). Alzheimer presenilin-1 mutations dramatically reduce trimming of long amyloid β-peptides (Aβ) by γ-secretase to increase 42-to-40-residue Aβ. *J. Biol. Chem.* 289, 31043–31052. doi:10.1074/jbc.M114.581165.

- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., and De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 191. doi:10.3389/fncel.2015.00191.
- Feyt, C., Pierrot, N., Tasiaux, B., Hees, J. V., Kienlen-Campard, P., Courtoy, P. J., et al. (2007). Phosphorylation of APP695 at Thr668 decreases c-cleavage and extracellular Ab. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7.
- Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., and de Oliveira, A. C. P. (2018). Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 329. doi:10.3389/fncel.2018.00329.
- Fitz, N. F., Wolfe, C. M., Playso, B. E., Biedrzycki, R. J., Lu, Y., Nam, K. N., et al. (2020). Trem2 deficiency differentially affects phenotype and transcriptome of human APOE3 and APOE4 mice. *Mol. Neurodegener.* 15, 41. doi:10.1186/s13024-020-00394-4.
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M. M., et al. (2002). A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J. Neurochem.* 81, 1011–1020. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00908.x.
- Foster, N. L., Chase, T. N., Fedio, P., Patronas, N. J., Brooks, R. A., and Di Chiro, G. (1983). Alzheimer's disease: focal cortical changes shown by positron emission tomography. *Neurology* 33, 961–965. doi:10.1212/wnl.33.8.961.
- Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2015). Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 125, 65–74. doi:10.1172/JCI73944.
- Fraldi, A., Klein, A. D., Medina, D. L., and Settembre, C. (2016). Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 277–295. doi:10.1146/annurev-neuro-070815-014031.
- Freude, K. K., Penjwini, M., Davis, J. L., LaFerla, F. M., and Blurton-Jones, M. (2011). Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 286, 24264–24274. doi:10.1074/jbc.M111.227421.
- Frisoni, G. B., Pievani, M., Testa, C., Sabbatoli, F., Bresciani, L., Bonetti, M., et al. (2007). The topography of grey matter involvement in early and late onset Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 130, 720–730. doi:10.1093/brain/awl377.
- Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J., and Feany, M. B. (2014). Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat. Neurosci.* 17, 357–366. doi:10.1038/nn.3639.

- Fukuma, T., Mostaert, A. S., Serpell, L. C., and Jarvis, S. P. (2008). Revealing molecular-level surface structure of amyloid fibrils in liquid by means of frequency modulation atomic force microscopy. *Nanotechnology* 19, 384010. doi:10.1088/0957-4484/19/38/384010.
- Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T. C., Ito, Y., Yokofujita, J., et al. (1998). Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am. J. Pathol.* 152, 983–992.
- Galas, M.-C., Bonnefoy, E., Buee, L., and Lefebvre, B. (2019). Emerging Connections Between Tau and Nucleic Acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1184, 135–143. doi:10.1007/978-981-32-9358-8_12.
- Galas, M.-C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., et al. (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 281, 19296–19304. doi:10.1074/jbc.M601849200.
- Gamba, P., Testa, G., Gargiulo, S., Staurengi, E., Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2015). Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7, 119. doi:10.3389/fnagi.2015.00119.
- Gao, Y., Tan, L., Yu, J.-T., and Tan, L. (2018). Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Curr. Alzheimer Res.* 15. doi:10.2174/1567205014666170417111859.
- Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., et al. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24, 516–524. doi:10.1016/j.nbd.2006.08.017.
- Garcia-Osta, A., and Alberini, C. M. (2009). Amyloid beta mediates memory formation. *Learn. Mem.* 16, 267–272. doi:10.1101/lm.1310209.
- Garwood, C. J., Ratcliffe, L. E., Simpson, J. E., Heath, P. R., Ince, P. G., and Wharton, S. B. (2017). Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 281–298. doi:10.1111/nan.12338.
- Gay, M., Carato, P., Coevoet, M., Renault, N., Larchanché, P.-E., Barczyk, A., et al. (2018a). New phenylaniline derivatives as modulators of amyloid protein precursor metabolism. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 2151–2164. doi:10.1016/j.bmc.2018.03.016.
- Gay, M., Evrard, C., Descamps, F., Carato, P., Renault, N., Coevoet, M., et al. (2018b). A phenotypic approach to the discovery of compounds that promote non-amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein:

- Toward a new profile of indirect β -secretase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 159, 104–125. doi:10.1016/j.ejmech.2018.08.092.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., et al. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* 112, 24–49. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.
- Gholivand, K., Hosseini, Z., Farshadian, S., and Naderi-Manesh, H. (2010). Synthesis, characterization, oxidative degradation, antibacterial activity and acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibitory effects of some new phosphorus(V) hydrazides. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 5130–5139. doi:10.1016/j.ejmech.2010.08.025.
- Giannakopoulos, P., Gold, G., Duc, M., Michel, J. P., Hof, P. R., and Bouras, C. (2000). Impaired processing of famous faces in Alzheimer's disease is related to neurofibrillary tangle densities in the prefrontal and anterior cingulate cortex. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11, 336–341. doi:10.1159/000017263.
- Gillman, K. W., Starrett, J. E., Parker, M. F., Xie, K., Bronson, J. J., Marcin, L. R., et al. (2010). Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable γ -Secretase Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* 1, 120–124. doi:10.1021/ml1000239.
- Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., et al. (2005). Clinical effects of A immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64, 1553–1562. doi:10.1212/01.WNL.0000159740.16984.3C.
- Giudetti, A. M., Romano, A., Lavecchia, A. M., and Gaetani, S. (2016). The Role of Brain Cholesterol and its Oxidized Products in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 13, 198–205. doi:10.2174/1567205012666150921103426.
- Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., et al. (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10582–10587. doi:10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009.
- Glabe, C. G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 283, 29639–29643. doi:10.1074/jbc.R800016200.
- Glennner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890. doi:10.1016/s0006-291x(84)80190-4.
- Goedert, M., and Spillantini, M. G. (2019). Ordered Assembly of Tau Protein and Neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1184, 3–21. doi:10.1007/978-981-32-9358-8_1.

- Goedert, M., Spillantini, M. G., and Crowther, R. A. (1992). Cloning of a Big tau Microtubule-Associated Protein Characteristic of the Peripheral Nervous System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1983–1987.
- Goldbaum, O., Oppermann, M., Handschuh, M., Dabir, D., Zhang, B., Forman, M. S., et al. (2003). Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8872–8880.
- Goldgaber, D., Lerman, M., McBride, O., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877–880. doi:10.1126/science.3810169.
- Gomes, L. A., Hipp, S. A., Rijal Upadhaya, A., Balakrishnan, K., Ospitalieri, S., Koper, M. J., et al. (2019). Aβ-induced acceleration of Alzheimer-related τ-pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 138, 913–941. doi:10.1007/s00401-019-02053-5.
- Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Damuni, Z., and Iqbal, K. (1994). Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase-1 and -2C and its implication in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 341, 94–98. doi:10.1016/0014-5793(94)80247-5.
- Gong, C. X., Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x.
- González, A. E., Muñoz, V. C., Cavieres, V. A., Bustamante, H. A., Cornejo, V.-H., Januário, Y. C., et al. (2017). Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31, 2446–2459. doi:10.1096/fj.201600713R.
- Goodman, Y., and Mattson, M. P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* 128, 1–12. doi:10.1006/exnr.1994.1107.
- Goodwin, L. O., Splinter, E., Davis, T. L., Urban, R., He, H., Braun, R. E., et al. (2019). Large-scale discovery of mouse transgenic integration sites reveals frequent structural variation and insertional mutagenesis. *Genome Res.* 29, 494–505. doi:10.1101/gr.233866.117.
- Götz, J. (2001). Tau and transgenic animal models. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 266–286. doi:10.1016/s0165-0173(01)00055-8.
- Götz, J. J., and Götz, J. (2019). Experimental Models of Tauopathy - From Mechanisms to Therapies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1184, 381–391. doi:10.1007/978-981-32-9358-8_28.

- Gough, N. R., Hatem, C. L., and Fambrough, D. M. (1995). The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA Cell Biol.* 14, 863–867. doi:10.1089/dna.1995.14.863.
- Gouras, G. K., Tampellini, D., Takahashi, R. H., and Capetillo-Zarate, E. (2010). Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 523–541. doi:10.1007/s00401-010-0679-9.
- Gowing, E., Roher, A. E., Woods, A. S., Cotter, R. J., Chaney, M., Little, S. P., et al. (1994). Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 269, 10987–10990.
- Grabowski, T. J., Cho, H. S., Vonsattel, J. P., Rebeck, G. W., and Greenberg, S. M. (2001). Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* 49, 697–705. doi:10.1002/ana.1009.
- Grady, C. L., McIntosh, A. R., Beig, S., Keightley, M. L., Burian, H., and Black, S. E. (2003). Evidence from functional neuroimaging of a compensatory prefrontal network in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 986–993.
- Gratuze, M., and Planel, E. (2017). Regulation of brain insulin signaling: A new function for tau. *J. Exp. Med.* 214, 2171–2173. doi:10.1084/jem.20170979.
- Green, R. C. (2009). Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients With Mild Alzheimer DiseaseA Randomized Controlled Trial. *JAMA* 302, 2557. doi:10.1001/jama.2009.1866.
- Grimm, M. O. W., Mett, J., Stahlmann, C. P., Haupenthal, V. J., Zimmer, V. C., and Hartmann, T. (2013). Neprilysin and Aβ Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnagi.2013.00098.
- Grundke-Iqbal, I., Wisniewski, H. M., and BINDERT, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein X (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Med. Sci.*, 5.
- Gu, J., Congdon, E. E., and Sigurdsson, E. M. (2013). Two Novel Tau Antibodies Targeting the 396/404 Region Are Primarily Taken Up by Neurons and Reduce Tau Protein Pathology. *J. Biol. Chem.* 288, 33081–33095. doi:10.1074/jbc.M113.494922.
- Guo, J. L., and Lee, V. M.-Y. (2011). Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J. Biol. Chem.* 286, 15317–15331. doi:10.1074/jbc.M110.209296.

- Guo, J. L., Narasimhan, S., Changoikar, L., He, Z., Stieber, A., Zhang, B., et al. (2016). Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J. Exp. Med.* 213, 2635–2654. doi:10.1084/jem.20160833.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325. doi:10.1038/359322a0.
- Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., et al. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat. Neurosci.* 23, 701–706. doi:10.1038/s41593-020-0624-8.
- Hallinan, G. I., Vargas-Caballero, M., West, J., and Deinhardt, K. (2019). Tau Misfolding Efficiently Propagates between Individual Intact Hippocampal Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 39, 9623–9632. doi:10.1523/JNEUROSCI.1590-19.2019.
- Hämäläinen, A., Pihlajamäki, M., Tanila, H., Hänninen, T., Niskanen, E., Tervo, S., et al. (2007). Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 28, 1889–1903. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.008.
- Hamano, T., Gendron, T. F., Causevic, E., Yen, S.-H., Lin, W.-L., Isidoro, C., et al. (2008). Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1119–1130. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06084.x.
- Hamilton, R. L. (2000). Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 10, 378–384. doi:10.1111/j.1750-3639.2000.tb00269.x.
- Hempel, H., Vassar, R., De Strooper, B., Hardy, J., Willem, M., Singh, N., et al. (2021). The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* 89, 745–756. doi:10.1016/j.biopsych.2020.02.001.
- Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., and Anderton, B. H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147, 58–62. doi:10.1016/0304-3940(92)90774-2.
- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E. A., Fuller, J., Hui, J. O., et al. (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J. Biol. Chem.* 275, 21099–21106. doi:10.1074/jbc.M002095200.

- Hansen, D. V., Hanson, J. E., and Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 217, 459–472. doi:10.1083/jcb.201709069.
- Hansson, O., Lehmann, S., Otto, M., Zetterberg, H., and Lewczuk, P. (2019). Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid β (A β) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res. Ther.* 11, 34. doi:10.1186/s13195-019-0485-0.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889. doi:10.1038/nature04724.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339. doi:10.1083/jcb.97.2.329.
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Sci. New Ser.* 256, 184–185.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. doi:10.1126/science.1072994.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–1093. doi:10.1038/ng.440.
- Hastings, N. B., Wang, X., Song, L., Butts, B. D., Grotz, D., Hargreaves, R., et al. (2017). Inhibition of O-GlcNAcase leads to elevation of O-GlcNAc tau and reduction of tauopathy and cerebrospinal fluid tau in rTg4510 mice. *Mol. Neurodegener.* 12, 39. doi:10.1186/s13024-017-0181-0.
- Haydon, P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193. doi:10.1038/35058528.
- He, G., Qing, H., Cai, F., Kwok, C., Xu, H., Yu, G., et al. (2006). Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of A β 1. *J. Neurochem.* 99, 1403–1412. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04184.x.
- He, G., Qing, H., Tong, Y., Cai, F., Ishiura, S., and Song, W. (2007). Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome. *J. Neurochem.* 101, 982–992. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04449.x.
- He, H. J., Wang, X. S., Pan, R., Wang, D. L., Liu, M. N., and He, R. Q. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol.* 10, 81. doi:10.1186/1471-2121-10-81.

- He, X., Zhu, G., Koelsch, G., Rodgers, K. K., Zhang, X. C., and Tang, J. (2003). Biochemical and structural characterization of the interaction of memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain with the VHS domain of GGA proteins. *Biochemistry* 42, 12174–12180. doi:10.1021/bi035199h.
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., et al. (2018). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med.* 24, 29–38. doi:10.1038/nm.4443.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rülcke, T., et al. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 7951–7963.
- Hebron, M. L., Javidnia, M., and Moussa, C. E.-H. (2018). Tau clearance improves astrocytic function and brain glutamate-glutamine cycle. *J. Neurol. Sci.* 391, 90–99. doi:10.1016/j.jns.2018.06.005.
- Hefter, D., and Draguhn, A. (2017). APP as a Protective Factor in Acute Neuronal Insults. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 22. doi:10.3389/fnmol.2017.00022.
- Hendriks, L., van Duijn, C. M., Cras, P., Cruts, M., Van Hul, W., van Harskamp, F., et al. (1992). Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat. Genet.* 1, 218–221. doi:10.1038/ng0692-218.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., and Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372. doi:10.1038/nrn3880.
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* 18, 794–799. doi:10.1038/nn.4017.
- Hirata-Fukae, C., Li, H.-F., Ma, L., Hoe, H.-S., Rebeck, G. W., Aisen, P. S., et al. (2009). Levels of soluble and insoluble tau reflect overall status of tau phosphorylation in vivo. *Neurosci. Lett.* 450, 51–55. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.023.
- Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N., and Robinson, M. S. (2000). A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* 149, 67–80. doi:10.1083/jcb.149.1.67.
- Holmes, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., et al. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E3138–E3147. doi:10.1073/pnas.1301440110.

- Holtman, I. R., Raj, D. D., Miller, J. A., Schaafsma, W., Yin, Z., Brouwer, N., et al. (2015). Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 31. doi:10.1186/s40478-015-0203-5.
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716. doi:10.1126/science.aad8373.
- Hooper, C., Killick, R., and Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease: GSK3 and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 104, 1433–1439. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x.
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., et al. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.030.
- Hopp, S. C., Lin, Y., Oakley, D., Roe, A. D., DeVos, S. L., Hanlon, D., et al. (2018). The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 15, 269. doi:10.1186/s12974-018-1309-z.
- Hounjet, J., Habets, R., Schaaf, M. B., Hendrickx, T. C., Barbeau, L. M. O., Yahyanejad, S., et al. (2019). The anti-malarial drug chloroquine sensitizes oncogenic NOTCH1 driven human T-ALL to γ -secretase inhibition. *Oncogene* 38, 5457–5468. doi:10.1038/s41388-019-0802-x.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., et al. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831–843. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.035.
- Hu, X., Das, B., Hou, H., He, W., and Yan, R. (2018). BACE1 deletion in the adult mouse reverses preformed amyloid deposition and improves cognitive functions. *J. Exp. Med.* 215, 927–940. doi:10.1084/jem.20171831.
- Hu, X., Fan, Q., Hou, H., and Yan, R. (2016a). Neurological dysfunctions associated with altered BACE1-dependent Neuregulin-1 signaling. *J. Neurochem.* 136, 234–249. doi:10.1111/jnc.13395.
- Hu, X., He, W., Luo, X., Tsubota, K. E., and Yan, R. (2013). BACE1 regulates hippocampal astrogenesis via the Jagged1-Notch pathway. *Cell Rep.* 4, 40–49. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.005.
- Hu, Y., Li, X.-C., Wang, Z., Luo, Y., Zhang, X., Liu, X.-P., et al. (2016b). Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin. *Oncotarget* 7, 17356–17368. doi:10.18632/oncotarget.7861.

- Hua, Q., He, R.-Q., Haque, N., Qu, M.-H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., et al. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 413–421. doi:10.1007/s000180300034.
- Huang, K.-L., Marcora, E., Pimenova, A. A., Di Narzo, A. F., Kapoor, M., Jin, S. C., et al. (2017). A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 20, 1052–1061. doi:10.1038/nn.4587.
- Hurtado, D. E., Molina-Porcel, L., Carroll, J. C., Macdonald, C., Aboagye, A. K., Trojanowski, J. Q., et al. (2012). Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 7392–7402. doi:10.1523/JNEUROSCI.0889-12.2012.
- Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M.-Y., and Doms, R. W. (2002). Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 277, 16278–16284. doi:10.1074/jbc.M111141200.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275, 33729–33737. doi:10.1074/jbc.M004175200.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., et al. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 419–427. doi:10.1006/mcne.1999.0811.
- Hyman, B. T. (1992). Down syndrome and Alzheimer disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* 379, 123–142.
- Ikeda, C., Yokota, O., Nagao, S., Ishizu, H., Oshima, E., Hasegawa, M., et al. (2016). The Relationship Between Development of Neuronal and Astrocytic Tau Pathologies in Subcortical Nuclei and Progression of Argyrophilic Grain Disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 26, 488–505. doi:10.1111/bpa.12319.
- Ikonomovic, M. D., Klunk, W. E., Abrahamson, E. E., Mathis, C. A., Price, J. C., Tsopelas, N. D., et al. (2008). Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain* 131, 1630–1645. doi:10.1093/brain/awn016.
- Ilshner, S., and Brandt, R. (1996). The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. 12.
- Imbimbo, B. P., and Watling, M. (2019). Investigational BACE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 28, 967–975. doi:10.1080/13543784.2019.1683160.

- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., et al. (2004). Early A beta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62, 925–931. doi:10.1212/01.WNL.0000115115.98960.37.
- Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2005). Pharmacological approaches of neurofibrillary degeneration. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 335–341. doi:10.2174/1567205054367810.
- Ishida, A., Furukawa, K., Keller, J. N., and Mattson, M. P. (1997). Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport* 8, 2133–2137. doi:10.1097/00001756-199707070-00009.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., et al. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325, 167–172. doi:10.1016/0014-5793(93)81066-9.
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., et al. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 575, 669–673. doi:10.1038/s41586-019-1769-z.
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., and Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.* 24, 173–182. doi:10.1016/0165-5728(89)90115-x.
- Ittner, A., Bertz, J., Suh, L. S., Stevens, C. H., Götz, J., and Ittner, L. M. (2015). Tau-targeting passive immunization modulates aspects of pathology in tau transgenic mice. *J. Neurochem.* 132, 135–145. doi:10.1111/jnc.12821.
- Ittner, A., and Ittner, L. M. (2018). Dendritic Tau in Alzheimer's Disease. *Neuron* 99, 13–27. doi:10.1016/j.neuron.2018.06.003.
- Ittner, L. M., and Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 65–72. doi:10.1038/nrn2967.
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397. doi:10.1016/j.cell.2010.06.036.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., et al. (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550–1552. doi:10.1126/science.1059946.

- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (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, 45–53. doi:10.1016/0896-6273(94)90458-8.
- Jackson, R. J., Rudinskiy, N., Herrmann, A. G., Croft, S., Kim, J. M., Petrova, V., et al. (2016a). Human tau increases amyloid β plaque size but not amyloid β -mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 44, 3056–3066. doi:10.1111/ejn.13442.
- Jackson, S. J., Kerridge, C., Cooper, J., Cavallini, A., Falcon, B., Cella, C. V., et al. (2016b). Short Fibrils Constitute the Major Species of Seed-Competent Tau in the Brains of Mice Transgenic for Human P301S Tau. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 762–772. doi:10.1523/JNEUROSCI.3542-15.2016.
- Jadhav, S., Avila, J., Schöll, M., Kovacs, G. G., Kövari, E., Skrabana, R., et al. (2019). A walk through tau therapeutic strategies. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 22. doi:10.1186/s40478-019-0664-z.
- Jagust, W., Gitcho, A., Sun, F., Kuczynski, B., Mungas, D., and Haan, M. (2006). Brain imaging evidence of preclinical Alzheimer's disease in normal aging. *Ann. Neurol.* 59, 673–681. doi:10.1002/ana.20799.
- James, O. G., Doraiswamy, P. M., and Borges-Neto, S. (2015). PET Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Front. Neurol.* 6, 38. doi:10.3389/fneur.2015.00038.
- Jana, M., Palencia, C. A., and Pahan, K. (2008). Fibrillar Amyloid- β Peptides Activate Microglia via TLR2: Implications for Alzheimer's Disease. *J. Immunol.* 181, 7254–7262. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7254.
- Janelidze, S., Stomrud, E., Palmqvist, S., Zetterberg, H., van Westen, D., Jeromin, A., et al. (2016). Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci. Rep.* 6, 26801. doi:10.1038/srep26801.
- Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Borchelt, D. R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng.* 17, 157–165. doi:10.1016/s1389-0344(01)00067-3.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., et al. (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979–982. doi:10.1038/35050110.
- Ji, C., Tang, M., Zeidler, C., Höhfeld, J., and Johnson, G. V. (2019). BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation via autophagy in neuronal processes. *Autophagy* 15, 1199–1213. doi:10.1080/15548627.2019.1580096.

- Jiang, S., and Bhaskar, K. (2020). Degradation and Transmission of Tau by Autophagic-Endolysosomal Networks and Potential Therapeutic Targets for Tauopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 586731. doi:10.3389/fnmol.2020.586731.
- Jiao, S.-S., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Zhu, C., Wang, Q.-H., Shen, L.-L., et al. (2016). Sex Dimorphism Profile of Alzheimer's Disease-Type Pathologies in an APP/PS1 Mouse Model. *Neurotox. Res.* 29, 256–266. doi:10.1007/s12640-015-9589-x.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2020). Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J. Mol. Biol.* 432, 80–103. doi:10.1016/j.jmb.2019.07.016.
- Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A., and Klunk, W. E. (2012). Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006213–a006213. doi:10.1101/cshperspect.a006213.
- Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99. doi:10.1038/nature11283.
- Jouanne, M., Rault, S., and Voisin-Chiret, A.-S. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 139, 153–167. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.070.
- Kadavath, H., Cabrales Fontela, Y., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Overkamp, K., Biernat, J., et al. (2018). The Binding Mode of a Tau Peptide with Tubulin. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 57, 3246–3250. doi:10.1002/anie.201712089.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., et al. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937. doi:10.1016/s0896-6273(03)00124-7.
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., and Hol, E. M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease: GFAP and Vimentin in Alzheimer's Disease. *Glia* 63, 1036–1056. doi:10.1002/glia.22800.
- Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Jansen, A. H. P., et al. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PloS One* 7, e42823. doi:10.1371/journal.pone.0042823.

- Kandalepas, P. C., Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Zhao, J., Nicholson, D. A., and Vassar, R. (2013). The Alzheimer's β -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 329–352. doi:10.1007/s00401-013-1152-3.
- Kane, M. D., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Schwarz, R. D., et al. (2000). Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3606–3611.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.
- Karisetty, B. C., Bhatnagar, A., Armour, E. M., Beaver, M., Zhang, H., and Elefant, F. (2020). Amyloid- β Peptide Impact on Synaptic Function and Neuroepigenetic Gene Control Reveal New Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 577622. doi:10.3389/fnmol.2020.577622.
- Karran, E., Mercken, M., and De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 698–712. doi:10.1038/nrd3505.
- Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H.-M., Nachman, E., et al. (2018). Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep.* 23, 2039–2055. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.056.
- Kaufman, A. C., Salazar, S. V., Haas, L. T., Yang, J., Kostylev, M. A., Jeng, A. T., et al. (2015). Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice. *Ann. Neurol.* 77, 953–971. doi:10.1002/ana.24394.
- Kaufman, S. K., Sanders, D. W., Thomas, T. L., Ruchinskas, A. J., Vaquer-Alicea, J., Sharma, A. M., et al. (2016). Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron* 92, 796–812. doi:10.1016/j.neuron.2016.09.055.
- Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 365–381. doi:10.1038/s41580-018-0001-6.
- Kayed, R., and Lasagna-Reeves, C. A. (2013). Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J. Alzheimers Dis. JAD* 33 Suppl 1, S67-78. doi:10.3233/JAD-2012-129001.
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., and Ullrich, O. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 85, 115–122. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01642.x.

- Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G., and Brandt, R. (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 5583–5592.
- Kemppainen, N. M., Aalto, S., Wilson, I. A., Nagren, K., Helin, S., Bruck, A., et al. (2006). Voxel-based analysis of PET amyloid ligand [11C]PIB uptake in Alzheimer disease. *Neurology* 67, 1575–1580. doi:10.1212/01.wnl.0000240117.55680.0a.
- KIDD, M. (1963). Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature* 197, 192–193.
- Kienlen-Campard, P., Feyt, C., Huysseune, S., de Diesbach, P., N'Kuli, F., Courtoy, P. J., et al. (2006). Lactacystin decreases amyloid-beta peptide production by inhibiting beta-secretase activity. *J. Neurosci. Res.* 84, 1311–1322. doi:10.1002/jnr.21025.
- Killin, L. O. J., Starr, J. M., Shiue, I. J., and Russ, T. C. (2016). Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr.* 16, 175. doi:10.1186/s12877-016-0342-y.
- Kim, D. Y., Carey, B. W., Wang, H., Ingano, L. A. M., Binshtok, A. M., Wertz, M. H., et al. (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat. Cell Biol.* 9, 755–764. doi:10.1038/ncb1602.
- Kim, H.-S., Kim, E.-M., Lee, J.-P., Park, C. H., Kim, S., Seo, J.-H., et al. (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 β expression. *FASEB J.* 17, 1–28. doi:10.1096/fj.03-0106fje.
- Kim, J., Basak, J. M., and Holtzman, D. M. (2009). The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* 63, 287–303. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.026.
- Kimberly, W. T., and Wolfe, M. S. (2003). Identity and function of gamma-secretase. *J. Neurosci. Res.* 74, 353–360. doi:10.1002/jnr.10736.
- Kimura, A., Hata, S., and Suzuki, T. (2016). Alternative Selection of β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Cleavage Sites in Amyloid β -Protein Precursor (APP) Harboring Protective and Pathogenic Mutations within the A β Sequence. *J. Biol. Chem.* 291, 24041–24053. doi:10.1074/jbc.M116.744722.
- King, M. E., Kan, H.-M., Baas, P. W., Erisir, A., Glabe, C. G., and Bloom, G. S. (2006). Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J. Cell Biol.* 175, 541–546. doi:10.1083/jcb.200605187.

- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., and Hyman, B. T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J. Cell Sci.* 116, 3339–3346. doi:10.1242/jcs.00643.
- Kinoshita, A., Whelan, C. M., Berezovska, O., and Hyman, B. T. (2002). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 28530–28536. doi:10.1074/jbc.M203372200.
- Kins, S., Kurosinski, P., Nitsch, R. M., and Götz, J. (2003). Activation of the ERK and JNK Signaling Pathways Caused by Neuron-Specific Inhibition of PP2A in Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* 163, 833–843. doi:10.1016/S0002-9440(10)63444-X.
- Kitazume, S., Nakagawa, K., Oka, R., Tachida, Y., Ogawa, K., Luo, Y., et al. (2005). In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 280, 8589–8595. doi:10.1074/jbc.M409417200.
- Klevanski, M., Saar, M., Baumkötter, F., Weyer, S. W., Kins, S., and Müller, U. C. (2014). Differential role of APP and APLPs for neuromuscular synaptic morphology and function. *Mol. Cell. Neurosci.* 61, 201–210. doi:10.1016/j.mcn.2014.06.004.
- Klingenstein, R., Melnyk, P., Leliveld, S. R., Ryckebusch, A., and Korth, C. (2006). Similar structure-activity relationships of quinoline derivatives for antiprion and antimalarial effects. *J. Med. Chem.* 49, 5300–5308. doi:10.1021/jm0602763.
- Klinz, S. G., Schachner, M., and Maness, P. F. (1995). L1 and N-CAM antibodies trigger protein phosphatase activity in growth cone-enriched membranes. *J. Neurochem.* 65, 84–95. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.65010084.x.
- Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., et al. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B: Imaging Amyloid in AD with PIB. *Ann. Neurol.* 55, 306–319. doi:10.1002/ana.20009.
- Knaevelsrud, H., and Simonsen, A. (2010). Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. *FEBS Lett.* 584, 2635–2645. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.041.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884. doi:10.1038/nature04723.
- Konietzko, U., Goodger, Z. V., Meyer, M., Kohli, B. M., Bosset, J., Lahiri, D. K., et al. (2010). Co-localization of the amyloid precursor protein and Notch intracellular domains in nuclear transcription factories. *Neurobiol. Aging* 31, 58–73. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.001.

- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., and Novak, M. (2014). First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau–tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer’s disease model. *Alzheimers Res. Ther.* 6, 44. doi:10.1186/alzrt278.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., and Koo, C. H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 5), 991–998.
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524–530. doi:10.1016/s0962-8924(00)01852-3.
- Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9836–9841. doi:10.1073/pnas.161274798.
- Kovacs, G. G., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2017). Protein astrogliopathies in human neurodegenerative diseases and aging: Protein astrogliopathies. *Brain Pathol.* 27, 675–690. doi:10.1111/bpa.12536.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., et al. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47, 566–581.e9. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- Kretner, B., Trambauer, J., Fukumori, A., Mielke, J., Kuhn, P.-H., Kremmer, E., et al. (2016). Generation and deposition of A β 43 by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer’s disease. *EMBO Mol. Med.* 8, 458–465. doi:10.15252/emmm.201505952.
- Kroemer, G., and Jäättelä, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* 5, 886–897. doi:10.1038/nrc1738.
- Krüger, U., Wang, Y., Kumar, S., and Mandelkow, E.-M. (2012). Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiol. Aging* 33, 2291–2305. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.009.
- Kueper, J. K., Speechley, M., and Montero-Odasso, M. (2018). The Alzheimer’s Disease Assessment Scale–Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review. *J. Alzheimers Dis.* 63, 423–444. doi:10.3233/JAD-170991.

- Kuhn, P.-H., Koroniak, K., Hogl, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., et al. (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J.* 31, 3157–3168. doi:10.1038/emboj.2012.173.
- Kuhn, P.-H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S. F. (2007). Regulated Intramembrane Proteolysis of the Interleukin-1 Receptor II by α -, β -, and γ -Secretase. *J. Biol. Chem.* 282, 11982–11995. doi:10.1074/jbc.M700356200.
- Kumar-Singh, S. (2008). Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes Brain Behav.* 7, 67–82. doi:10.1111/j.1601-183X.2007.00380.x.
- Kumar-Singh, S. (2009). Hereditary and Sporadic Forms of A β -Cerebrovascular Amyloidosis and Relevant Transgenic Mouse Models. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1872–1895. doi:10.3390/ijms10041872.
- Kuo, Y. M., Kokjohn, T. A., Watson, M. D., Woods, A. S., Cotter, R. J., Sue, L. I., et al. (2000). Elevated abeta42 in skeletal muscle of Alzheimer disease patients suggests peripheral alterations of AbetaPP metabolism. *Am. J. Pathol.* 156, 797–805. doi:10.1016/s0002-9440(10)64947-4.
- Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., et al. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J.* 29, 3408–3420. doi:10.1038/emboj.2010.211.
- Kwong, K. K., Belliveau, J. W., Chesler, D. A., Goldberg, I. E., Weisskoff, R. M., Poncelet, B. P., et al. (1992). Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5675–5679. doi:10.1073/pnas.89.12.5675.
- La Joie, R., Visani, A. V., Baker, S. L., Brown, J. A., Bourakova, V., Cha, J., et al. (2020). Prospective longitudinal atrophy in Alzheimer's disease correlates with the intensity and topography of baseline tau-PET. *Sci. Transl. Med.* 12, eaau5732. doi:10.1126/scitranslmed.aau5732.
- Labbadia, J., and Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 435–464. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033955.
- Lacosta, A.-M., Pascual-Lucas, M., Pesini, P., Casabona, D., Pérez-Grijalba, V., Marcos-Campos, I., et al. (2018). Safety, tolerability and immunogenicity of an active anti-A β 40 vaccine (ABvac40) in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I trial. *Alzheimers Res. Ther.* 10, 12. doi:10.1186/s13195-018-0340-8.

- Lam, S., Boluda, S., Hérard, A.-S., Petit, F., Eddarkaoui, S., Cambon, K., et al. (2021). Alzheimer's brain inoculation in A β -plaque bearing mice: synaptic loss is linked to tau seeding and low microglial activity. *Neuroscience* doi:10.1101/2021.04.06.438654.
- Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., et al. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice. *Nat. Genet.* 5, 22–30. doi:10.1038/ng0993-22.
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H. W. M., Mastroeni, D., et al. (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 131, 21–64. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.002.
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., et al. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci. Rep.* 2, 700. doi:10.1038/srep00700.
- Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128–1132. doi:10.1038/nature07761.
- Laurent, C., Buée, L., and Blum, D. (2018). Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomed. J.* 41, 21–33. doi:10.1016/j.bj.2018.01.003.
- Laurent, C., Dorothée, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., et al. (2017). Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* 140, 184–200. doi:10.1093/brain/aww270.
- Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J.-D., Ranaldi, S., et al. (2012). The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 16243–11655a. doi:10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012.
- Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M.-G., Barkats, M., et al. (2016). Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 132, 257–276. doi:10.1007/s00401-016-1577-6.
- Lax, N., Fainstein, N., Nishri, Y., Ben-Zvi, A., and Ben-Hur, T. (2020). Systemic microbial TLR2 agonists induce neurodegeneration in Alzheimer's disease mice. *J. Neuroinflammation* 17, 55. doi:10.1186/s12974-020-01738-z.

- Le Freche, H., Brouillette, J., Fernandez-Gomez, F.-J., Patin, P., Caillierez, R., Zommer, N., et al. (2012). Tau Phosphorylation and Sevoflurane Anesthesia: An Association to Postoperative Cognitive Impairment. *Anesthesiology* 116, 779–787. doi:10.1097/ALN.0b013e31824be8c7.
- Le Guennec, K., Quenez, O., Nicolas, G., Wallon, D., Rousseau, S., Richard, A.-C., et al. (2017). 17q21.31 duplication causes prominent tau-related dementia with increased MAPT expression. *Mol. Psychiatry* 22, 1119–1125. doi:10.1038/mp.2016.226.
- Leal, S. L., Lockhart, S. N., Maass, A., Bell, R. K., and Jagust, W. J. (2018). Subthreshold Amyloid Predicts Tau Deposition in Aging. *J. Neurosci.* 38, 4482–4489. doi:10.1523/JNEUROSCI.0485-18.2018.
- Lebouvier, T., Pasquier, F., and Buée, L. (2017). Update on tauopathies. *Curr. Opin. Neurol.* 30, 589–598. doi:10.1097/WCO.0000000000000502.
- Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., et al. (2014). Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3825–E3830. doi:10.1073/pnas.1410315111.
- Lee, H.-G., Castellani, R. J., Zhu, X., Perry, G., and Smith, M. A. (2005). Amyloid-beta in Alzheimer's disease: the horse or the cart? Pathogenic or protective? *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 133–138. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00429.x.
- Lee, J., Chen, Y., Tolstykh, T., and Stock, J. (1996). A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6043–6047. doi:10.1073/pnas.93.12.6043.
- Lee, K. J., Moussa, C. E. H., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B. W., Turner, R. S., et al. (2010a). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* 169, 344–356. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.078.
- Lee, K. J., Moussa, C. E. H., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B. W., Turner, R. S., et al. (2010b). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* 169, 344–356. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.078.
- Lee, M. J., Lee, J. H., and Rubinsztein, D. C. (2013). Tau degradation: The ubiquitin–proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog. Neurobiol.* 105, 49–59. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.03.001.
- Lee, M.-S., Kao, S.-C., Lemere, C. A., Xia, W., Tseng, H.-C., Zhou, Y., et al. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J. Cell Biol.*, 13.

- Lee, M.-S., and Tsai, L.-H. (2003). Cdk5: One of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *J. Alzheimers Dis.* 5, 127–137. doi:10.3233/JAD-2003-5207.
- Lehéricy, S., Baulac, M., Chiras, J., Piérot, L., Martin, N., Pillon, B., et al. (1994). Amygdalohippocampal MR volume measurements in the early stages of Alzheimer disease. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 15, 929–937.
- Leroy, K., Ando, K., Laporte, V., Dedecker, R., Suain, V., Authelet, M., et al. (2012). Lack of Tau Proteins Rescues Neuronal Cell Death and Decreases Amyloidogenic Processing of APP in APP/PS1 Mice. *Am. J. Pathol.* 181, 1928–1940. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.012.
- Leroy, M., Vaudran, L., Deramecourt, V., Pasquier, F., Chen, Y., Schraen, S., et al. (2021). Biomarqueurs du liquide cébrospinal. *Prat. Neurol. - FMC* 12, 165–179. doi:10.1016/j.praneu.2021.03.014.
- Leugers, C. J., Koh, J. Y., Hong, W., and Lee, G. (2013). Tau in MAPK Activation. *Front. Neurol.* 4. doi:10.3389/fneur.2013.00161.
- Leuzy, A., Smith, R., Ossenkoppele, R., Santillo, A., Borroni, E., Klein, G., et al. (2020). Diagnostic Performance of RO948 F 18 Tau Positron Emission Tomography in the Differentiation of Alzheimer Disease From Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA Neurol.* 77, 955–965. doi:10.1001/jamaneurol.2020.0989.
- Levin, E. C., Acharya, N. K., Sedeyn, J. C., Venkataraman, V., D’Andrea, M. R., Wang, H.-Y., et al. (2009). Neuronal expression of vimentin in the Alzheimer’s disease brain may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism. *Brain Res.* 1298, 194–207. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.072.
- Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., et al. (1990). Mutation of the Alzheimer’s disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124–1126. doi:10.1126/science.2111584.
- Lewczuk, P., Matzen, A., Blennow, K., Parnetti, L., Molinuevo, J. L., Eusebi, P., et al. (2017). Cerebrospinal Fluid A β 42/40 Corresponds Better than A β 42 to Amyloid PET in Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 55, 813–822. doi:10.3233/JAD-160722.
- Li, C., Ebrahimi, A., and Schluesener, H. (2013). Drug pipeline in neurodegeneration based on transgenic mice models of Alzheimer’s disease. *Ageing Res. Rev.* 12, 116–140. doi:10.1016/j.arr.2012.09.002.
- Li, C., and Götz, J. (2017). Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 863–883. doi:10.1038/nrd.2017.155.
- Li, Q., and Südhof, T. C. (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J. Biol. Chem.* 279, 10542–10550. doi:10.1074/jbc.M310001200.

- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.-B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., et al. (2004). Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3632–3637. doi:10.1073/pnas.0205689101.
- Li, S., Hong, S., Shephardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M., and Selkoe, D. (2009). Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* 62, 788–801. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.012.
- Li, X.-C., Hu, Y., Wang, Z., Luo, Y., Zhang, Y., Liu, X.-P., et al. (2016). Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins. *Sci. Rep.* 6, 24756. doi:10.1038/srep24756.
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C.-A., Fowler, S. W., et al. (2015). NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85, 101–115. doi:10.1016/j.neuron.2014.11.018.
- Lichtlen, P., and Mohajeri, M. H. (2008). Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *J. Neurochem.* 104, 859–874. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05064.x.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. doi:10.1038/nature21029.
- Liesch, F., Kulic, L., Teunissen, C., Shobo, A., Ulku, I., Engelschalt, V., et al. (2019). A β 34 is a BACE1-derived degradation intermediate associated with amyloid clearance and Alzheimer's disease progression. *Nat. Commun.* 10, 2240. doi:10.1038/s41467-019-10152-w.
- Liedtke, W., Edelman, W., Bieri, P. L., Chiu, F.-C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R., et al. (1996). GFAP Is Necessary for the Integrity of CNS White Matter Architecture and Long-Term Maintenance of Myelination. *Neuron* 17, 607–615. doi:10.1016/S0896-6273(00)80194-4.
- Lipton, J. O., and Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. *Neuron* 84, 275–291. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x.

- Liu, G.-P., Wei, W., Zhou, X., Shi, H.-R., Liu, X.-H., Chai, G.-S., et al. (2013). Silencing PP2A inhibitor by lenti-shRNA interference ameliorates neuropathologies and memory deficits in tg2576 mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 2247–2257. doi:10.1038/mt.2013.189.
- Liu, K., Solano, I., Mann, D., Lemere, C., Mercken, M., Trojanowski, J. Q., et al. (2006). Characterization of A β 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 163–174. doi:10.1007/s00401-006-0077-5.
- Liu, M. C., Kobeissy, F., Zheng, W., Zhang, Z., Hayes, R. L., and Wang, K. K. W. (2010). Dual Vulnerability of Tau to Calpains and Caspase-3 Proteolysis Under Neurotoxic and Neurodegenerative Conditions. *ASN Neuro* 3, AN20100012. doi:10.1042/AN20100012.
- Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A. J., Penke, B., et al. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid β peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1098–1107. doi:10.4049/jimmunol.1101121.
- Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A. J., Penke, B., et al. TLR2 Is a Primary Receptor for Alzheimer's Amyloid b Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation. *J. Immunol.*, 11.
- Liu, S.-L., Wang, C., Jiang, T., Tan, L., Xing, A., and Yu, J.-T. (2016). The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 53, 4328–4342. doi:10.1007/s12035-015-9369-x.
- Lo Cascio, F., Garcia, S., Montalbano, M., Puangmalai, N., McAllen, S., Pace, A., et al. (2020). Modulating disease-relevant tau oligomeric strains by small molecules. *J. Biol. Chem.* 295, 14807–14825. doi:10.1074/jbc.RA120.014630.
- Löffler, J., and Huber, G. (1992). Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J. Neurochem.* 59, 1316–1324. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb08443.x.
- Lonskaya, I., Hebron, M. L., Desforgues, N. M., Franjie, A., and Moussa, C. E.-H. (2013). Tyrosine kinase inhibition increases functional parkin-Beclin-1 interaction and enhances amyloid clearance and cognitive performance. *EMBO Mol. Med.* 5, 1247–1262. doi:10.1002/emmm.201302771.
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., and Binder, L. I. (1990). Identification of Nuclear τ Isoforms in Human Neuroblastoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8422–8426.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S. Ch., Zinkowski, R. P., and Binder, L. I. (1995). Functional Implications for the Microtubule-Associated Protein Tau: Localization in Oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10369–10373.

- Lord, A., Philipson, O., Klingstedt, T., Westermarck, G., Hammarström, P., Nilsson, K. P. R., et al. (2011). Observations in APP bitransgenic mice suggest that diffuse and compact plaques form via independent processes in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 178, 2286–2298. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.052.
- Lorenzen, A., Samosh, J., Vandewark, K., Anborgh, P. H., Seah, C., Magalhaes, A. C., et al. (2010). Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway. *Mol. Brain* 3, 11. doi:10.1186/1756-6606-3-11.
- Lovestone, S., Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J. O., Huppertz, H.-J., et al. (2015). A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 45, 75–88. doi:10.3233/JAD-141959.
- Lovestone, S., Reynolds, C. H., Latimer, D., Davis, D. R., Anderton, B. H., Gallo, J. M., et al. (1994). Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr. Biol. CB* 4, 1077–1086. doi:10.1016/s0960-9822(00)00246-3.
- Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X., et al. (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat. Med.* 6, 397–404. doi:10.1038/74656.
- Lu, D. C., Soriano, S., Bredesen, D. E., and Koo, E. H. (2003). Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J. Neurochem.* 87, 733–741. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02059.x.
- Lu, J.-X., Qiang, W., Yau, W.-M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., and Tycko, R. (2013a). Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* 154, 1257–1268. doi:10.1016/j.cell.2013.08.035.
- Lu, Y. F., Kojima, N., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Matsushita, M., Obata, K., et al. (1999). Enhanced synaptic transmission and reduced threshold for LTP induction in fyn-transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 75–82. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00407.x.
- Lu, Y., He, H.-J., Zhou, J., Miao, J.-Y., Lu, J., He, Y.-G., et al. (2013b). Hyperphosphorylation Results in Tau Dysfunction in DNA Folding and Protection. *J. Alzheimers Dis.* 37, 551–563. doi:10.3233/JAD-130602.
- Ludewig, S., and Korte, M. (2016). Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 161. doi:10.3389/fnmol.2016.00161.
- Luna-Munoz, J., R., C., M., C., Flores-Rodriguez, P., Avila, J., R., S., et al. (2013). "Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease," in *Understanding Alzheimer's Disease*, ed. I. Zerr (InTech). doi:10.5772/54228.
- Luo, H.-B., Xia, Y.-Y., Shu, X.-J., Liu, Z.-C., Feng, Y., Liu, X.-H., et al. (2014). SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16586–16591. doi:10.1073/pnas.1417548111.

- Luo, M., Leski, M. L., and Andreadis, A. (2004). Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J. Cell. Biochem.* 91, 880–895. doi:10.1002/jcb.20029.
- Luo, W., Liu, W., Hu, X., Hanna, M., Caravaca, A., and Paul, S. M. (2015). Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci. Rep.* 5, 11161. doi:10.1038/srep11161.
- Luo, Y. (2003). BACE1 (β -secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiol. Dis.* 14, 81–88. doi:10.1016/S0969-9961(03)00104-9.
- Ly, P. T. T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., et al. (2013). Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J. Clin. Invest.* 123, 224–235. doi:10.1172/JCI64516.
- Macdonald, A., Briggs, K., Poppe, M., Higgins, A., Velayudhan, L., and Lovestone, S. (2008). A feasibility and tolerability study of lithium in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 23, 704–711. doi:10.1002/gps.1964.
- MacLeod, R., Hillert, E.-K., Cameron, R. T., and Baillie, G. S. (2015). The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Sci. OA* 1, fso.15.9. doi:10.4155/fso.15.9.
- Madeira, A., Pommet, J. M., Prochiantz, A., and Allinquant, B. (2005). SET protein (TAF1 β , I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1905–1907. doi:10.1096/fj.05-3839fje.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5644–5651. doi:10.1073/pnas.0600549103.
- Mahoney, E., Maddocks, K., Flynn, J., Jones, J., Cole, S. L., Zhang, X., et al. (2013). Identification of endoplasmic reticulum stress-inducing agents by antagonizing autophagy: a new potential strategy for identification of anti-cancer therapeutics in B-cell malignancies. *Leuk. Lymphoma* 54, 2685–2692. doi:10.3109/10428194.2013.781168.
- Maia, L. F., Kaeser, S. A., Reichwald, J., Hruscha, M., Martus, P., Staufenbiel, M., et al. (2013). Changes in amyloid- β and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci. Transl. Med.* 5, 194re2. doi:10.1126/scitranslmed.3006446.

- Mailliot, C., Sergeant, N., Bussière, T., Caillet-Boudin, M. L., Delacourte, A., and Buée, L. (1998). Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett.* 433, 201–204. doi:10.1016/s0014-5793(98)00910-7.
- Manczak, M., and Reddy, P. H. (2012). Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5131–5146. doi:10.1093/hmg/ddc360.
- Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R., et al. (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* 314, 315–321. doi:10.1016/0014-5793(92)81496-9.
- Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1995). Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol. Aging* 16, 355–362. doi:10.1016/0197-4580(95)00025-A.
- Mannini, B., Mulvihill, E., Sgromo, C., Cascella, R., Khodarahmi, R., Ramazzotti, M., et al. (2014). Toxicity of protein oligomers is rationalized by a function combining size and surface hydrophobicity. *ACS Chem. Biol.* 9, 2309–2317. doi:10.1021/cb500505m.
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., et al. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Sci. Rep.* 6, 33047. doi:10.1038/srep33047.
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R. M., et al. (2015). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* 138, 1738–1755. doi:10.1093/brain/awv081.
- Marambaud, P., Ancolio, K., Lopez-Perez, E., and Checler, F. (1998). Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A beta 42 recovery from human cells. *Mol. Med. Camb. Mass* 4, 147–157.
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., et al. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J. Exp. Med.* 214, 2257–2269. doi:10.1084/jem.20161731.
- Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13. doi:10.12703/P6-13.

- Martini-Stoica, H., Cole, A. L., Swartzlander, D. B., Chen, F., Wan, Y.-W., Bajaj, L., et al. (2018). TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J. Exp. Med.* 215, 2355–2377. doi:10.1084/jem.20172158.
- Martone, R. L., Zhou, H., Atchison, K., Comery, T., Xu, J. Z., Huang, X., et al. (2009). Begacestat (GSI-953): A Novel, Selective Thiophene Sulfonamide Inhibitor of Amyloid Precursor Protein γ -Secretase for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331, 598–608. doi:10.1124/jpet.109.152975.
- Marwarha, G., Raza, S., Meiers, C., and Ghribi, O. (2014). Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- β genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1842, 1587–1595. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.015.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249. doi:10.1073/pnas.82.12.4245.
- Matrone, C., Iannuzzi, F., and Annunziato, L. (2019). The Y682ENPTY687 motif of APP: Progress and insights toward a targeted therapy for Alzheimer's disease patients. *Ageing Res. Rev.* 52, 120–128. doi:10.1016/j.arr.2019.04.003.
- Mattson, M. P., Barger, S. W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V. L., and Rydel, R. E. (1993). beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16, 409–414. doi:10.1016/0166-2236(93)90009-b.
- Mattsson, N., Palmqvist, S., Stomrud, E., Vogel, J., and Hansson, O. (2019). Staging β -Amyloid Pathology With Amyloid Positron Emission Tomography. *JAMA Neurol.* 76, 1319. doi:10.1001/jamaneurol.2019.2214.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., et al. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774. doi:10.1126/science.1197623.
- Mayer, S. C., Kreft, A. F., Harrison, B., Abou-Gharbia, M., Antane, M., Aschmies, S., et al. (2008). Discovery of Begacestat, a Notch-1-Sparing γ -Secretase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* 51, 7348–7351. doi:10.1021/jm801252w.
- McCall, M. A., Gregg, R. G., Behringer, R. R., Brenner, M., Delaney, C. L., Galbreath, E. J., et al. (1996). Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 6361–6366. doi:10.1073/pnas.93.13.6361.

- McDonald, C. L., Hennessy, E., Rubio-Araiz, A., Keogh, B., McCormack, W., McGuirk, P., et al. (2016a). Inhibiting TLR2 activation attenuates amyloid accumulation and glial activation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain. Behav. Immun.* 58, 191–200. doi:10.1016/j.bbi.2016.07.143.
- McDonald, C. L., Hennessy, E., Rubio-Araiz, A., Keogh, B., McCormack, W., McGuirk, P., et al. (2016b). Inhibiting TLR2 activation attenuates amyloid accumulation and glial activation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain. Behav. Immun.* 58, 191–200. doi:10.1016/j.bbi.2016.07.143.
- McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 22, 799–809. doi:10.1016/s0197-4580(01)00289-5.
- McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., et al. (2005). Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47, 191–199. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.030.
- Meckler, X., and Checler, F. (2016). Presenilin 1 and Presenilin 2 Target γ -Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments. *J. Biol. Chem.* 291, 12821–12837. doi:10.1074/jbc.M115.708297.
- Melnyk, P., Sergeant, N., Buée, L., and Delacourte, A. (2006). Use of 1, 4-bis (3-aminopropyl) piperazine derivatives in therapy.
- Melnyk, P., Vingtdeux, V., Burlet, S., Eddarkaoui, S., Grosjean, M.-E., Larchanché, P.-E., et al. (2015). Chloroquine and Chloroquinoline Derivatives as Models for the Design of Modulators of Amyloid Peptide Precursor Metabolism. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 559–569. doi:10.1021/cn5003013.
- Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., et al. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93, 1015–1034. doi:10.1016/j.neuron.2017.01.022.
- Merezhko, M., Uronen, R.-L., and Huttunen, H. J. (2020). The Cell Biology of Tau Secretion. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 569818. doi:10.3389/fnmol.2020.569818.
- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., et al. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12683–12688. doi:10.1073/pnas.95.21.12683.
- Michel, C. H., Kumar, S., Pinotsi, D., Tunnacliffe, A., St George-Hyslop, P., Mandelkow, E., et al. (2014). Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology. *J. Biol. Chem.* 289, 956–967. doi:10.1074/jbc.M113.515445.

- Michel, G., Mercken, M., Murayama, M., Noguchi, K., Ishiguro, K., Imahori, K., et al. (1998). Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3 β and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1380, 177–182. doi:10.1016/s0304-4165(97)00139-6.
- Midthune, B., Tyan, S.-H., Walsh, J. J., Sarsoza, F., Eggert, S., Hof, P. R., et al. (2012). Deletion of the amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) does not affect hippocampal neuron morphology or function. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 448–455. doi:10.1016/j.mcn.2012.02.001.
- Mignon, L., Kordasiewicz, H., Lane, R., Smith, A., Miller, T., Narayanan, P., et al. (2018). Design of the First-in-Human Study of IONIS-MAPTRx, a Tau-lowering Antisense Oligonucleotide, in Patients With Alzheimer Disease (S2.006). *Neurology* 90, S2.006.
- Milosch, N., Tanriöver, G., Kundu, A., Rami, A., François, J.-C., Baumkötter, F., et al. (2014). Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP α -induced activation of the Akt survival pathway. *Cell Death Dis.* 5, e1391–e1391. doi:10.1038/cddis.2014.352.
- Minami, S. S., Hoe, H.-S., and Rebeck, G. W. (2011). Fyn kinase regulates the association between amyloid precursor protein and Dab1 by promoting their localization to detergent-resistant membranes: Fyn phosphorylation of APP and Dab1 in DRMs. *J. Neurochem.* 118, 879–890. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07296.x.
- Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., and Love, S. (2008). Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 18, 240–252. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00132.x.
- Minkeviciene, R., Ihalaenen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., et al. (2008). Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J. Neurochem.* 105, 584–594. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x.
- Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fülöp, L., et al. (2009). Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3453–3462. doi:10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009.
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K. A., Foster, N. L., and Kuhl, D. E. (1997). Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 42, 85–94. doi:10.1002/ana.410420114.
- Mirbaha, H., Holmes, B. B., Sanders, D. W., Bieschke, J., and Diamond, M. I. (2015). Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation. *J. Biol. Chem.* 290, 14893–14903. doi:10.1074/jbc.M115.652693.

- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207.
- Moore, S., Evans, L. D. B., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T. B., et al. (2015). APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons. *Cell Rep.* 11, 689–696. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.068.
- Mori, H., Kondo, J., and Ihara, Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235, 1641–1644. doi:10.1126/science.3029875.
- Morimoto, B. H., Schmechel, D., Hirman, J., Blackwell, A., Keith, J., and Gold, M. (2013). A Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending-Dose, Randomized Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Effects on Cognition of AL-108 after 12 Weeks of Intranasal Administration in Subjects with Mild Cognitive Impairment. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 35, 325–339. doi:10.1159/000348347.
- Morkuniene, R., Cizas, P., Jankeviciute, S., Petrolis, R., Arandarcikaite, O., Krisciukaitis, A., et al. (2015). Small A β 1-42 oligomer-induced membrane depolarization of neuronal and microglial cells: role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci. Res.* 93, 475–486. doi:10.1002/jnr.23510.
- Morley, J. E., Armbricht, H. J., Farr, S. A., and Kumar, V. B. (2012). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 650–656. doi:10.1016/j.bbadis.2011.11.015.
- Morrone, C. D., Liu, M., Black, S. E., and McLaurin, J. (2015). Interaction between therapeutic interventions for Alzheimer's disease and physiological A β clearance mechanisms. *Front. Aging Neurosci.* 7, 64. doi:10.3389/fnagi.2015.00064.
- Mucke, L., and Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006338. doi:10.1101/cshperspect.a006338.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., et al. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat. Genet.* 1, 345–347. doi:10.1038/ng0892-345.
- Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., and Richter-Landsberg, C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res.* 288, 239–249. doi:10.1007/s004410050809.
- Müller, U. C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 281–298. doi:10.1038/nrn.2017.29.

- Murakami, N., Oyama, F., Gu, Y., McLennan, I. S., Nonaka, I., and Ihara, Y. (1998). Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 664–673. doi:10.1097/00005072-199807000-00003.
- Muresan, V., and Ladescu Muresan, Z. (2015). Amyloid- β precursor protein: Multiple fragments, numerous transport routes and mechanisms. *Exp. Cell Res.* 334, 45–53. doi:10.1016/j.yexcr.2014.12.014.
- Murray, M. M., Bernstein, S. L., Nyugen, V., Condrón, M. M., Teplow, D. B., and Bowers, M. T. (2009). Amyloid β Protein: A β 40 Inhibits A β 42 Oligomerization. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6316–6317. doi:10.1021/ja8092604.
- Musiek, E. S., and Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen.” *Nat. Neurosci.* 18, 800–806. doi:10.1038/nn.4018.
- Muszyński, P., Groblewska, M., Kulczyńska-Przybik, A., Kułakowska, A., and Mroczko, B. (2017). YKL-40 as a Potential Biomarker and a Possible Target in Therapeutic Strategies of Alzheimer’s Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 906–917. doi:10.2174/1570159X15666170208124324.
- Myeku, N., Clelland, C. L., Emrani, S., Kukushkin, N. V., Yu, W. H., Goldberg, A. L., et al. (2016). Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat. Med.* 22, 46–53. doi:10.1038/nm.4011.
- Nagele, R. G., D’Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V., and Wang, H.-Y. (2003). Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* 971, 197–209. doi:10.1016/s0006-8993(03)02361-8.
- Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., et al. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer’s disease. *Nature* 554, 249–254. doi:10.1038/nature25456.
- Nakayama, K., Ohkawara, T., Hiratochi, M., Koh, C.-S., and Nagase, H. (2008). The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis. *Neurosci. Lett.* 444, 127–131. doi:10.1016/j.neulet.2008.08.034.
- Nalbantoglu, J., Tirado-Santiago, G., Lahsaïni, A., Poirier, J., Goncalves, O., Verge, G., et al. (1997). Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 387, 500–505. doi:10.1038/387500a0.
- Nam, T., Han, J. H., Devkota, S., and Lee, H.-W. (2017). Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Mol. Cells* 40, 897–905. doi:10.14348/molcells.2017.0226.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* 31, 137–155. doi:10.1007/BF02705243.

- Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., et al. (2017). Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 11406–11423. doi:10.1523/JNEUROSCI.1230-17.2017.
- Nath, S., Agholme, L., Kurudenkandy, F. R., Granseth, B., Marcusson, J., and Hallbeck, M. (2012). Spreading of Neurodegenerative Pathology via Neuron-to-Neuron Transmission of α -Amyloid. *J. Neurosci.* 32, 8767–8777. doi:10.1523/JNEUROSCI.0615-12.2012.
- Naudé, P. J. W., Nyakas, C., Eiden, L. E., Ait-Ali, D., van der Heide, R., Engelborghs, S., et al. (2012). Lipocalin 2: novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 2811–2823. doi:10.1096/fj.11-202457.
- Nelissen, N., Van Laere, K., Thurfjell, L., Owenius, R., Vandenbulcke, M., Koole, M., et al. (2009). Phase 1 study of the Pittsburgh compound B derivative 18F-flutemetamol in healthy volunteers and patients with probable Alzheimer disease. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 50, 1251–1259. doi:10.2967/jnumed.109.063305.
- Netzer, W. J., Bettayeb, K., Sinha, S. C., Flajolet, M., Greengard, P., and Bustos, V. (2017). Gleevec shifts APP processing from a β -cleavage to a nonamyloidogenic cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 1389–1394. doi:10.1073/pnas.1620963114.
- Neve, R. (1988). Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1, 669–677. doi:10.1016/0896-6273(88)90166-3.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., and Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol. Brain Res.* 1, 271–280. doi:10.1016/0169-328X(86)90033-1.
- Nhan, H. S., Chiang, K., and Koo, E. H. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 1–19. doi:10.1007/s00401-014-1347-2.
- Nicholls, R. E., Sontag, J.-M., Zhang, H., Staniszewski, A., Yan, S., Kim, C. Y., et al. (2016). PP2A methylation controls sensitivity and resistance to β -amyloid-induced cognitive and electrophysiological impairments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3347–3352. doi:10.1073/pnas.1521018113.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989. doi:10.1038/nature07767.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., et al. (2001). The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat. Neurosci.* 4, 887–893. doi:10.1038/nn0901-887.

- Nitsch, R. M., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1996). Regulation of APP processing. Potential for the therapeutical reduction of brain amyloid burden. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 175–182. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb34416.x.
- Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19, 983–997. doi:10.1038/nm.3232.
- Nixon, R. A. (2017). Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J.* 31, 2729–2743. doi:10.1096/fj.201700359.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., et al. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 113–122. doi:10.1093/jnen/64.2.113.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., et al. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38, 555–565. doi:10.1016/s0896-6273(03)00259-9.
- Novak, P., Zilka, N., Zilkova, M., Kovacech, B., Skrabana, R., Ondrus, M., et al. (2018). AADVAC1, AN ACTIVE IMMUNOTHERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE AND NON ALZHEIMER TAUOPATHIES: AN OVERVIEW OF PRECLINICAL AND CLINICAL DEVELOPMENT. *J. Prev. Alzheimers Dis.*, 1–7. doi:10.14283/jpad.2018.45.
- Novakovic, D., Feligioni, M., Scaccianoce, S., Caruso, A., Piccinin, S., Schepisi, C., et al. (2013). Profile of gantenerumab and its potential in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des. Devel. Ther.* 7, 1359–1364. doi:10.2147/DDDT.S53401.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., et al. (2001). Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 759–767. doi:10.1093/jnen/60.8.759.
- Nussbaum, J. M., Schilling, S., Cynis, H., Silva, A., Swanson, E., Wangsanut, T., et al. (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature* 485, 651–655. doi:10.1038/nature11060.
- Nygaard, H. B. (2018). Targeting Fyn Kinase in Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* 83, 369–376. doi:10.1016/j.biopsych.2017.06.004.
- Nygaard, H. B., and Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates the toxicity of beta-amyloid oligomers: implications for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 66, 1325–1328. doi:10.1001/archneurol.2009.223.

- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39, 409–421. doi:10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
- Ogawa, S., Lee, T.-M., Nayak, A. S., and Glynn, P. (1990). Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn. Reson. Med.* 14, 68–78. doi:10.1002/mrm.1910140108.
- Ogris, E., Du, X., Nelson, K. C., Mak, E. K., Yu, X. X., Lane, W. S., et al. (1999). A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 274, 14382–14391. doi:10.1074/jbc.274.20.14382.
- Ohkawara, T., Nagase, H., Koh, C.-S., and Nakayama, K. (2011). The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. *Gene* 475, 1–9. doi:10.1016/j.gene.2010.11.014.
- Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1907–1913. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x.
- O'Leary, J. C., Li, Q., Marinec, P., Blair, L. J., Congdon, E. E., Johnson, A. G., et al. (2010). Phenothiazine-mediated rescue of cognition in tau transgenic mice requires neuroprotection and reduced soluble tau burden. *Mol. Neurodegener.* 5, 45. doi:10.1186/1750-1326-5-45.
- Olesen, O. F. (1994). Proteolytic Degradation of Microtubule-Associated Protein τ by Thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 716–721. doi:10.1006/bbrc.1994.1759.
- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., et al. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 15, 673–684. doi:10.1016/S1474-4422(16)00070-3.
- Onos, K. D., Uyar, A., Keezer, K. J., Jackson, H. M., Preuss, C., Acklin, C. J., et al. (2019). Enhancing face validity of mouse models of Alzheimer's disease with natural genetic variation. *PLoS Genet.* 15, e1008155. doi:10.1371/journal.pgen.1008155.
- Ordóñez-Gutiérrez, L., Antón, M., and Wandosell, F. (2015). Peripheral amyloid levels present gender differences associated with aging in A β PP/PS1 mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* 44, 1063–1068. doi:10.3233/JAD-141158.
- Ostrowitzki, S. (2012). Mechanism of Amyloid Removal in Patients With Alzheimer Disease Treated With Gantenerumab. *Arch. Neurol.* 69, 198. doi:10.1001/archneurol.2011.1538.

- Otani, N., Nawashiro, H., Fukui, S., Ooigawa, H., Ohsumi, A., Toyooka, T., et al. (2006). Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *J. Clin. Neurosci.* 13, 934–938. doi:10.1016/j.jocn.2005.10.018.
- Otth, C., Concha, I. I., Arendt, T., Stieler, J., Schliebs, R., González-Billault, C., et al. (2002). AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J. Alzheimers Dis. JAD* 4, 417–430. doi:10.3233/jad-2002-4508.
- Ozaki, T., Li, Y., Kikuchi, H., Tomita, T., Iwatsubo, T., and Nakagawara, A. (2006). The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 57–63. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.162.
- Ozdemir, M. B., Erdogan, C., Iwasaki, K., Watanabe, T., Ishikane, S., and Fujiwara, M. (2013). Injection of specific amyloid-beta oligomers ($\text{beta}_{1-40}:\text{beta}_{1-42} = 10:1$) into rat medial septum impairs memory retention without inducing hippocampal apoptosis. *Neurol. Res.* 35, 798–803. doi:10.1179/1743132813Y.0000000195.
- Pallàs, M. (2012). Senescence-Accelerated Mice P8: A Tool to Study Brain Aging and Alzheimer's Disease in a Mouse Model. *ISRN Cell Biol.* 2012, 1–12. doi:10.5402/2012/917167.
- Palmqvist, S., Janelidze, S., Quiroz, Y. T., Zetterberg, H., Lopera, F., Stomrud, E., et al. (2020). Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA* 324, 772–781. doi:10.1001/jama.2020.12134.
- Palop, J. J., and Mucke, L. (2009). Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 66, 435–440. doi:10.1001/archneurol.2009.15.
- Palop, J. J., and Mucke, L. (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 13, 812–818. doi:10.1038/nn.2583.
- Papegaey, A., Eddarkaoui, S., Deramecourt, V., Fernandez-Gomez, F.-J., Pantano, P., Obriot, H., et al. (2016). Reduced Tau protein expression is associated with frontotemporal degeneration with progranulin mutation. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 74. doi:10.1186/s40478-016-0345-0.
- Papon, M.-A., El Khoury, N. B., Marcouiller, F., Julien, C., Morin, F., Bretteville, A., et al. (2013). Deregulation of Protein Phosphatase 2A and Hyperphosphorylation of Protein Following Onset of Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* 62, 609–617. doi:10.2337/db12-0187.
- Paravastu, A. K., Qahwash, I., Leapman, R. D., Meredith, S. C., and Tycko, R. (2009). Seeded growth of beta-amyloid fibrils from Alzheimer's brain-derived fibrils produces a distinct fibril structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7443–7448. doi:10.1073/pnas.0812033106.

- Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012). The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD: AICD production, regulation, degradation and function. *J. Neurochem.* 120, 109–124. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x.
- Park, H.-J., Lee, K.-W., Oh, S., Yan, R., Zhang, J., Beach, T. G., et al. (2018). Protein Phosphatase 2A and Its Methylation Modulating Enzymes LCMT-1 and PME-1 Are Dysregulated in Tauopathies of Progressive Supranuclear Palsy and Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 77, 139–148. doi:10.1093/jnen/nlx110.
- Park, J., Jang, M., and Chang, S. (2013). Deleterious effects of soluble amyloid- β oligomers on multiple steps of synaptic vesicle trafficking. *Neurobiol. Dis.* 55, 129–139. doi:10.1016/j.nbd.2013.03.004.
- Park, J.-S., Kim, D.-H., and Yoon, S.-Y. (2016). Regulation of amyloid precursor protein processing by its KFERQ motif. *BMB Rep.* 49, 337–343. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.6.212.
- Park, S. A., Shaked, G. M., Bredesen, D. E., and Koo, E. H. (2009). Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 450–455. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.042.
- Pascoal, T. A., Benedet, A. L., Ashton, N. J., Kang, M. S., Therriault, J., Chamoun, M., et al. (2021). Microglial activation and tau propagate jointly across Braak stages. *Nat. Med.* doi:10.1038/s41591-021-01456-w.
- Pascoal, T. A., Mathotaarachchi, S., Shin, M., Benedet, A. L., Mohades, S., Wang, S., et al. (2017). Synergistic interaction between amyloid and tau predicts the progression to dementia. *Alzheimers Dement.* 13, 644–653. doi:10.1016/j.jalz.2016.11.005.
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Schettini, G., et al. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J. Alzheimers Dis. JAD* 2, 289–301. doi:10.3233/jad-2000-23-408.
- Pastorino, L., Ikin, A. F., Nairn, A. C., Pursnani, A., and Buxbaum, J. D. (2002). The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(β). *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 175–185. doi:10.1006/mcne.2001.1065.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615–622. doi:10.1038/45159.
- Peeraer, E., Bottelbergs, A., Van Kolen, K., Stancu, I.-C., Vasconcelos, B., Mahieu, M., et al. (2015). Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 73, 83–95. doi:10.1016/j.nbd.2014.08.032.

- Pekny, M., Stanness, K. A., Eliasson, C., Betsholtz, C., and Janigro, D. (1998). Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* 22, 390–400.
- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., and McBain, C. J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol. Rev.* 97, 1619–1747. doi:10.1152/physrev.00007.2017.
- Peng, C., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M.-Y. (2020). Protein transmission in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 16, 199–212. doi:10.1038/s41582-020-0333-7.
- Penke, B., Bogár, F., and Fülöp, L. (2017). β -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules* 22, 1692. doi:10.3390/molecules22101692.
- Penke, B., Szűcs, M., and Bogár, F. (2020). Oligomerization and Conformational Change Turn Monomeric β -Amyloid and Tau Proteins Toxic: Their Role in Alzheimer's Pathogenesis. *Molecules* 25, 1659. doi:10.3390/molecules25071659.
- Perea, J. R., Ávila, J., and Bolós, M. (2018). Dephosphorylated rather than hyperphosphorylated Tau triggers a pro-inflammatory profile in microglia through the p38 MAPK pathway. *Exp. Neurol.* 310, 14–21. doi:10.1016/j.expneurol.2018.08.007.
- Pereira, J. B., Westman, E., Hansson, O., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2017). Association between cerebrospinal fluid and plasma neurodegeneration biomarkers with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 58, 14–29. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.002.
- Perez-Nievas, B. G., Stein, T. D., Tai, H.-C., Dols-Icardo, O., Scotton, T. C., Barroeta-Espar, I., et al. (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* 136, 2510–2526. doi:10.1093/brain/awt171.
- Peric, A., and Annaert, W. (2015). Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 363–381. doi:10.1007/s00401-014-1379-7.
- Perry, G., Friedman, R., Shaw, G., and Chau, V. (1987). Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3033–3036. doi:10.1073/pnas.84.9.3033.
- Petersen, R. C., Smith, G. E., Waring, S. C., Ivnik, R. J., Tangalos, E. G., and Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 56, 303–308. doi:10.1001/archneur.56.3.303.
- Peters-Libeu, C., Campagna, J., Mitumori, M., Poksay, K. S., Spilman, P., Sabogal, A., et al. (2015). sA β PP α is a Potent Endogenous Inhibitor of BACE1. *J. Alzheimers Dis. JAD* 47, 545–555. doi:10.3233/JAD-150282.

- Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M.-Y., and Klein, P. S. (2003). GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423, 435–439. doi:10.1038/nature01640.
- Phillips, E. C., Croft, C. L., Kurbatskaya, K., O'Neill, M. J., Hutton, M. L., Hanger, D. P., et al. (2014). Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1321–1325. doi:10.1042/BST20140155.
- Phinney, A. L., Deller, T., Stalder, M., Calhoun, M. E., Frotscher, M., Sommer, B., et al. (1999). Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 8552–8559.
- Pickett, E. K., Herrmann, A. G., McQueen, J., Abt, K., Dando, O., Tulloch, J., et al. (2019). Amyloid Beta and Tau Cooperate to Cause Reversible Behavioral and Transcriptional Deficits in a Model of Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* 29, 3592–3604.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.11.044.
- Piedrahita, D., Castro-Alvarez, J. F., Boudreau, R. L., Villegas-Lanau, A., Kosik, K. S., Gallego-Gomez, J. C., et al. (2015). β -Secretase 1's Targeting Reduces Hyperphosphorylated Tau, Implying Autophagy Actors in 3xTg-AD Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 498. doi:10.3389/fncel.2015.00498.
- Piras, A., Collin, L., Grüninger, F., Graff, C., and Rönnebäck, A. (2016). Autophagic and lysosomal defects in human tauopathies: analysis of post-mortem brain from patients with familial Alzheimer disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 22. doi:10.1186/s40478-016-0292-9.
- Plummer, S., Van den Heuvel, C., Thornton, E., Corrigan, F., and Cappai, R. (2016). The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis.* 7, 163. doi:10.14336/AD.2015.0907.
- Pont, C., Ginex, T., Griñán-Ferré, C., Scheiner, M., Mattellone, A., Martínez, N., et al. (2021). From virtual screening hits targeting a cryptic pocket in BACE-1 to a nontoxic brain permeable multitarget anti-Alzheimer lead with disease-modifying and cognition-enhancing effects. *Eur. J. Med. Chem.* 225, 113779. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113779.
- Pooler, A. M., Phillips, E. C., Lau, D. H. W., Noble, W., and Hanger, D. P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* 14, 389–394. doi:10.1038/embor.2013.15.
- Pooler, A. M., Polydoro, M., Maury, E. A., Nicholls, S. B., Reddy, S. M., Wegmann, S., et al. (2015). Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 14. doi:10.1186/s40478-015-0199-x.

- Portelius, E., Forte, J., Molinuevo, J. L., Gustavsson, M. K., Andreasson, U., and Sanchez-Valle, R. (2012). The amyloid- β isoform pattern in cerebrospinal fluid in familial PSEN1 M139T- and L286P-associated Alzheimer's disease. *Mol. Med. Rep.* 5, 1111–1115. doi:10.3892/mmr.2012.774.
- Prabhu, Y., Burgos, P. V., Schindler, C., Farías, G. G., Magadár, J. G., and Bonifacino, J. S. (2012). Adaptor protein 2-mediated endocytosis of the β -secretase BACE1 is dispensable for amyloid precursor protein processing. *Mol. Biol. Cell* 23, 13.
- Price, J. L., and Morris, J. C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 45, 358–368. doi:10.1002/1531-8249(199903)45:3<358::aid-ana12>3.0.co;2-x.
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., and Arancio, O. (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem. Pharmacol.* 88, 450–467. doi:10.1016/j.bcp.2014.01.011.
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., et al. (2011). Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann. Neurol.* 69, 819–830. doi:10.1002/ana.22313.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., et al. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 14537–14545. doi:10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.
- Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y.-X., Zhao, Y.-F., and Li, Y.-M. (2015). A β 42 and A β 40: similarities and differences. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 21, 522–529. doi:10.1002/psc.2789.
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., et al. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* 273, 32730–32738. doi:10.1074/jbc.273.49.32730.
- Rademakers, R., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2003). Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *ScientificWorldJournal* 3, 497–519. doi:10.1100/tsw.2003.39.
- Rajamohamedsait, H., Rasool, S., Rajamohamedsait, W., Lin, Y., and Sigurdsson, E. M. (2017). Prophylactic Active Tau Immunization Leads to Sustained Reduction in Both Tau and Amyloid- β Pathologies in 3xTg Mice. *Sci. Rep.* 7, 17034. doi:10.1038/s41598-017-17313-1.
- Rajapaksha, T. W., Eimer, W. A., Bozza, T. C., and Vassar, R. (2011). The Alzheimer's β -secretase enzyme BACE1 is required for accurate axon guidance of olfactory sensory neurons and normal glomerulus formation in the olfactory bulb. *Mol. Neurodegener.* 6, 88. doi:10.1186/1750-1326-6-88.

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., et al. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11172–11177. doi:10.1073/pnas.0603838103.
- Rajmohan, R., and Reddy, P. H. (2017). Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. *J. Alzheimers Dis.* 57, 975–999. doi:10.3233/JAD-160612.
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6364–6369. doi:10.1073/pnas.092136199.
- Rauch, J. N. (2020). LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. 13.
- Reardon, W., and Harper, P. S. (1992). Advances in myotonic dystrophy: a clinical and genetic perspective. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 5, 605–609.
- Reddy, P. H., and Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14, 45–53. doi:10.1016/j.molmed.2007.12.002.
- Reddy, P. H., Mani, G., Park, B. S., Jacques, J., Murdoch, G., Whetsell, W., et al. (2005). Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J. Alzheimers Dis. JAD* 7, 103–117; discussion 173-180. doi:10.3233/jad-2005-7203.
- Reid, M. J., Beltran-Lobo, P., Johnson, L., Perez-Nievas, B. G., and Noble, W. (2020). Astrocytes in Tauopathies. *Front. Neurol.* 11, 572850. doi:10.3389/fneur.2020.572850.
- Reitz, C. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 369808. doi:10.1155/2012/369808.
- Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.* 88, 640–651. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024.
- Ren, R., Zhang, L., and Wang, M. (2018). Specific deletion connexin43 in astrocyte ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice. *Life Sci.* 208, 175–191. doi:10.1016/j.lfs.2018.07.033.
- Reyes-Marin, K. E., and Nuñez, A. (2017). Seizure susceptibility in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease and relationship with amyloid β plaques. *Brain Res.* 1677, 93–100. doi:10.1016/j.brainres.2017.09.026.
- Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R., and Anderton, B. H. (2000). Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-

- activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.* 74, 1587–1595. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0741587.x.
- Ricciarelli, R., and Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* 15. doi:10.2174/1570159X15666170116143743.
- Rice, H. C., de Malmazet, D., Schreurs, A., Frere, S., Van Molle, I., Volkov, A. N., et al. (2019). Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA_B R1a ligand to modulate synaptic transmission. *Science* 363, eaao4827. doi:10.1126/science.aao4827.
- Ridha, B. H., Barnes, J., Bartlett, J. W., Godbolt, A., Pepple, T., Rossor, M. N., et al. (2006). Tracking atrophy progression in familial Alzheimer's disease: a serial MRI study. *Lancet Neurol.* 5, 828–834. doi:10.1016/S1474-4422(06)70550-6.
- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 7817–7826. doi:10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007.
- Ris, M. M., Deitrich, R. A., and Von Wartburg, J. P. (1975). Inhibition of aldehyde reductase isoenzymes in human and rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1865–1869. doi:10.1016/0006-2952(75)90405-0.
- Rivera, S. (2019). Metalloproteinases in nervous system function and pathology: introduction. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 3051–3053. doi:10.1007/s00018-019-03172-8.
- Roberson, E. D., Halabisky, B., Yoo, J. W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., et al. (2011). Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 700–711. doi:10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., et al. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750–754. doi:10.1126/science.1141736.
- Rockenstein, E., Mante, M., Alford, M., Adame, A., Crews, L., Hashimoto, M., et al. (2005). High beta-secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid-beta levels: implications for the treatment of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 280, 32957–32967. doi:10.1074/jbc.M507016200.
- Rodríguez-Martín, T., Cuchillo-Ibáñez, I., Noble, W., Nyenya, F., Anderton, B. H., and Hanger, D. P. (2013). Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiol. Aging* 34, 2146–2157. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.015.

- Roe, C. M., Mintun, M. A., Ghoshal, N., Williams, M. M., Grant, E. A., Marcus, D. S., et al. (2010). Alzheimer disease identification using amyloid imaging and reserve variables: proof of concept. *Neurology* 75, 42–48. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e620f4.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., et al. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775–778. doi:10.1038/376775a0.
- Rosen et al. (1984). A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 141, 1356–1364. doi:10.1176/ajp.141.11.1356.
- Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10 Suppl, S10–17. doi:10.1038/nm1066.
- Rossini, P. M., Di Iorio, R., Vecchio, F., Anfossi, M., Babiloni, C., Bozzali, M., et al. (2020). Early diagnosis of Alzheimer's disease: the role of biomarkers including advanced EEG signal analysis. Report from the IFCN-sponsored panel of experts. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 131, 1287–1310. doi:10.1016/j.clinph.2020.03.003.
- Rowe, C. C., Ackerman, U., Browne, W., Mulligan, R., Pike, K. L., O'Keefe, G., et al. (2008). Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol.* 7, 129–135. doi:10.1016/S1474-4422(08)70001-2.
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780–786. doi:10.1038/nature05291.
- Ruiz-Riquelme, A., Lau, H. H. C., Stuart, E., Goczi, A. N., Wang, Z., Schmitt-Ulms, G., et al. (2018). Prion-like propagation of β -amyloid aggregates in the absence of APP overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 26. doi:10.1186/s40478-018-0529-x.
- Ryckebusch, A., Deprez-Poulain, R., Debreu-Fontaine, M.-A., Vandaele, R., Mouray, E., Grellier, P., et al. (2003a). Synthesis and antimalarial evaluation of new 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3783–3787. doi:10.1016/j.bmcl.2003.07.008.
- Ryckebusch, A., Deprez-Poulain, R., Maes, L., Debreu-Fontaine, M.-A., Mouray, E., Grellier, P., et al. (2003b). Synthesis and in vitro and in vivo antimalarial activity of N1-(7-chloro-4-quinolyl)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *J. Med. Chem.* 46, 542–557. doi:10.1021/jm020960r.
- Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Kaufman, R. J., Osten, P., and Vassar, R. (2014). Genetic inhibition of phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α does not block A β -dependent elevation of BACE1

- and APP levels or reduce amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS One* 9, e101643. doi:10.1371/journal.pone.0101643.
- Sadleir, K. R., Kandalepas, P. C., Buggia-Prévo, V., Nicholson, D. A., Thinakaran, G., and Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 132, 235–256. doi:10.1007/s00401-016-1558-9.
- Sagare, A., Deane, R., Bell, R. D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., et al. (2007). Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.* 13, 1029–1031. doi:10.1038/nm1635.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., et al. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell* 20, 131–139. doi:10.1016/j.devcel.2010.12.003.
- Saido, T., and Leissring, M. A. (2012). Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006379. doi:10.1101/cshperspect.a006379.
- Saint-Aubert, L., Almkvist, O., Chiotis, K., Almeida, R., Wall, A., and Nordberg, A. (2016). Regional tau deposition measured by [18F]THK5317 positron emission tomography is associated to cognition via glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 8, 38. doi:10.1186/s13195-016-0204-z.
- Salloway, S., Sperling, R., Fox, N. C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., et al. (2014). Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 322–333. doi:10.1056/NEJMoa1304839.
- Salloway, S., Sperling, R., Gilman, S., Fox, N. C., Blennow, K., Raskind, M., et al. (2009). A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73, 2061–2070. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c67808.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., and Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* 275, 27447–27456. doi:10.1074/jbc.M001394200.
- Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., et al. (2012). Exosome-associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 287, 3842–3849. doi:10.1074/jbc.M111.277061.
- Samari, H. R., and Seglen, P. O. (1998). Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23758–23763. doi:10.1074/jbc.273.37.23758.

- Samsonov, A., Yu, J.-Z., Rasenick, M., and Popov, S. V. (2004). Tau interaction with microtubules in vivo. *J. Cell Sci.* 117, 6129–6141. doi:10.1242/jcs.01531.
- Sanders, D. W., Kaufman, S. K., DeVos, S. L., Sharma, A. M., Mirbaha, H., Li, A., et al. (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82, 1271–1288. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.047.
- Sannerud, R., Esselens, C., Ejsmont, P., Mattera, R., Rochin, L., Tharkeshwar, A. K., et al. (2016). Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool. *Cell* 166, 193–208. doi:10.1016/j.cell.2016.05.020.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481. doi:10.1126/science.1113694.
- Sardar Sinha, M., Ansell-Schultz, A., Civitelli, L., Hildesjö, C., Larsson, M., Lannfelt, L., et al. (2018). Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 136, 41–56. doi:10.1007/s00401-018-1868-1.
- Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., et al. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 36, 2473–2487. doi:10.15252/embj.201797397.
- Satizabal, C. L., Beiser, A. S., Chouraki, V., Chêne, G., Dufouil, C., and Seshadri, S. (2016). Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 374, 523–532. doi:10.1056/NEJMoa1504327.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., et al. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467–1472. doi:10.1212/wnl.43.8.1467.
- Savva, G. M., Wharton, S. B., Ince, P. G., Forster, G., Matthews, F. E., Brayne, C., et al. (2009). Age, neuropathology, and dementia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2302–2309. doi:10.1056/NEJMoa0806142.
- Scheltens, P., Barkhof, F., Leys, D., Pruvo, J. P., Nauta, J. J., Vermersch, P., et al. (1993). A semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging. *J. Neurol. Sci.* 114, 7–12. doi:10.1016/0022-510x(93)90041-v.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870. doi:10.1038/nm0896-864.

- Schindler, S. E., Bollinger, J. G., Ovod, V., Mawuenyega, K. G., Li, Y., Gordon, B. A., et al. (2019). High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology* 93, e1647–e1659. doi:10.1212/WNL.0000000000008081.
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., et al. (2006). Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits. *Am. J. Pathol.* 169, 599–616. doi:10.2353/ajpath.2006.060002.
- Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 253–262. doi:10.1016/s0092-8674(00)00117-3.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38, 3549–3558. doi:10.1021/bi981874p.
- Schneider, A., Chatterjee, S., Bousiges, O., Selvi, B. R., Swaminathan, A., Cassel, R., et al. (2013). Acetyltransferases (HATs) as Targets for Neurological Therapeutics. *Neurotherapeutics* 10, 568–588. doi:10.1007/s13311-013-0204-7.
- Schöll, M., Carter, S. F., Westman, E., Rodriguez-Vieitez, E., Almkvist, O., Thordardottir, S., et al. (2015). Early astrocytosis in autosomal dominant Alzheimer's disease measured in vivo by multi-tracer positron emission tomography. *Sci. Rep.* 5, 16404. doi:10.1038/srep16404.
- Schöll, M., Lockhart, S. N., Schonhaut, D. R., O'Neil, J. P., Janabi, M., Ossenkoppele, R., et al. (2016). PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* 89, 971–982. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.028.
- Schrader-Fischer, G., and Paganetti, P. A. (1996). Effect of alkalizing agents on the processing of the beta-amyloid precursor protein. *Brain Res.* 716, 91–100. doi:10.1016/0006-8993(96)00002-9.
- Schueller, E., Paiva, I., Blanc, F., Wang, X.-L., Cassel, J.-C., Boutillier, A.-L., et al. (2020). Dysregulation of histone acetylation pathways in hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 33, 101–116. doi:10.1016/j.euroneuro.2020.01.015.
- Scott, C. W., Klika, A. B., Lo, M. M. S., Norris, T. E., and Caputo, C. B. (1992). Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: Comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment. *J. Neurosci. Res.* 33, 19–29. doi:10.1002/jnr.490330104.

- Scrivo, A., Bourdenx, M., Pampliega, O., and Cuervo, A. M. (2018). Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 17, 802–815. doi:10.1016/S1474-4422(18)30238-2.
- Seabrook, G. R., Smith, D. W., Bowery, B. J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S. M., et al. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38, 349–359. doi:10.1016/s0028-3908(98)00204-4.
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* 298, 789–791. doi:10.1126/science.1074069.
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* 192, 106–113. doi:10.1016/j.bbr.2008.02.016.
- Selkoe, D. J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M. B., Koo, E. H., Teplow, D. B., et al. (1996). The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 57–64. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb34401.x.
- Sengupta, S., Horowitz, P. M., Karsten, S. L., Jackson, G. R., Geschwind, D. H., Fu, Y., et al. (2006). Degradation of Tau Protein by Puromycin-Sensitive Aminopeptidase in Vitro. *Biochemistry* 45, 15111–15119. doi:10.1021/bi061830d.
- Sengupta, U., Nilson, A. N., and Kaye, R. (2016). The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* 6, 42–49. doi:10.1016/j.ebiom.2016.03.035.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224. doi:10.1586/14789450.5.2.207.
- Sergeant, N., David, J. P., Lefranc, D., Vermersch, P., Watzel, A., and Delacourte, A. (1997). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett.* 412, 578–582. doi:10.1016/s0014-5793(97)00859-4.
- Sergeant, N., David, J.-P., Champain, D., Ghestem, A., Watzel, A., and Delacourte, A. (2002). Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 81, 663–672. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00901.x.
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 179–197. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.020.
- Sergeant, N., Fernandez-Gomez, F.-J., Obriot, H., Eddarkaoui, S., Buée-Scherrer, V., and Buée, L. (2017). “Two-Dimensional Electrophoresis Protocols to Analyze the Microtubule-Associated Tau Proteins from Several

- Biological Sources,” in *Tau Protein Methods in Molecular Biology*, ed. C. Smet-Nocca (New York, NY: Springer New York), 251–261. doi:10.1007/978-1-4939-6598-4_14.
- Sergeant, N., Vingtdeux, V., Eddarkaoui, S., Gay, M., Evrard, C., Le Fur, N., et al. (2019). New piperazine multi-effect drugs prevent neurofibrillary degeneration and amyloid deposition, and preserve memory in animal models of Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Dis.* 129, 217–233. doi:10.1016/j.nbd.2019.03.028.
- Sergeant, N., Wattez, A., and Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively “exon 10” isoforms. *J. Neurochem.* 72, 1243–1249. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0721243.x.
- Sergeant, N., Wattez, A., Galvn-valencia, M., Ghestem, A., David, J.-P., Lemoine, J., et al. (2003). Association of atp synthase α -chain with neurofibrillary degeneration in alzheimer’s disease. *Neuroscience* 117, 293–303. doi:10.1016/S0306-4522(02)00747-9.
- Serneels, L., T’Syen, D., Perez-Benito, L., Theys, T., Holt, M. G., and De Strooper, B. (2020). Modeling the β -secretase cleavage site and humanizing amyloid-beta precursor protein in rat and mouse to study Alzheimer’s disease. *Mol. Neurodegener.* 15, 60. doi:10.1186/s13024-020-00399-z.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., et al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303, 1832–1840. doi:10.1001/jama.2010.574.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer’s beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325–327. doi:10.1038/359325a0.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., et al. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer’s disease. *Nature* 537, 50–56. doi:10.1038/nature19323.
- Seward, M. E., Swanson, E., Norambuena, A., Reimann, A., Cochran, J. N., Li, R., et al. (2013). Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer’s disease. *J. Cell Sci.* 126, 1278–1286. doi:10.1242/jcs.1125880.
- Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., et al. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435–447. doi:10.1016/j.cell.2005.05.022.
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., and Sabatini, B. L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2866–2875. doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.

- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842. doi:10.1038/nm1782.
- Sharma, A. M., Thomas, T. L., Woodard, D. R., Kashmer, O. M., and Diamond, M. I. (2018). Tau monomer encodes strains. *eLife* 7, e37813. doi:10.7554/eLife.37813.
- Sharma, V. K., Mehta, V., and Singh, T. G. (2020). Alzheimer's Disorder: Epigenetic Connection and Associated Risk Factors. *Curr. Neuropharmacol.* 18, 740–753. doi:10.2174/1570159X18666200128125641.
- Shentu, Y.-P., Huo, Y., Feng, X.-L., Gilbert, J., Zhang, Q., Liuyang, Z.-Y., et al. (2018). CIP2A Causes Tau/APP Phosphorylation, Synaptopathy, and Memory Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* 24, 713–723. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.009.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760. doi:10.1038/375754a0.
- Shi, Q., Chowdhury, S., Ma, R., Le, K. X., Hong, S., Caldarone, B. J., et al. (2017). Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. *Sci. Transl. Med.* 9, eaaf6295. doi:10.1126/scitranslmed.aaf6295.
- Shi, X.-P., Tugusheva, K., Bruce, J. E., Lucka, A., Wu, G.-X., Chen-Dodson, E., et al. (2003). Beta-secretase cleavage at amino acid residue 34 in the amyloid beta peptide is dependent upon gamma-secretase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 21286–21294. doi:10.1074/jbc.M209859200.
- Shiba, T., Kametaka, S., Kawasaki, M., Shibata, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., et al. (2004). Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1. *Traffic Cph. Den.* 5, 437–448. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00188.x.
- Shipton, O. A., Leitz, J. R., Dworzak, J., Acton, C. E. J., Tunbridge, E. M., Denk, F., et al. (2011). Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 1688–1692. doi:10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011.
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., et al. (2001). Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J. Biol. Chem.* 276, 21895–21901. doi:10.1074/jbc.M008511200.

- Sigala, J., Jumeau, F., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., Ballot, C., Rigot, J.-M., et al. (2014). Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J. Androl.* 16, 927–928. doi:10.4103/1008-682X.136446.
- Silva, M. C., Ferguson, F. M., Cai, Q., Donovan, K. A., Nandi, G., Patnaik, D., et al. (2019). Targeted degradation of aberrant tau in frontotemporal dementia patient-derived neuronal cell models. *eLife* 8, e45457. doi:10.7554/eLife.45457.
- Silva, M. C., Nandi, G. A., Tentarelli, S., Gurrell, I. K., Jamier, T., Lucente, D., et al. (2020). Prolonged tau clearance and stress vulnerability rescue by pharmacological activation of autophagy in tauopathy neurons. *Nat. Commun.* 11, 3258. doi:10.1038/s41467-020-16984-1.
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., et al. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 6, 6. doi:10.3390/biom6010006.
- Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J. Neurochem.* 64, 1420–1423. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64031420.x.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., et al. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537–540. doi:10.1038/990114.
- Sironi, J. J., Yen, S. H., Gondal, J. A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1998). Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett.* 436, 471–475. doi:10.1016/s0014-5793(98)01185-5.
- Slater, A. F. (1993). Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* 57, 203–235. doi:10.1016/0163-7258(93)90056-j.
- Small, S. A., Perera, G. M., DeLaPaz, R., Mayeux, R., and Stern, Y. (1999). Differential regional dysfunction of the hippocampal formation among elderly with memory decline and Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 45, 466–472. doi:10.1002/1531-8249(199904)45:4<466::aid-ana8>3.0.co;2-q.
- Socher, E., Sticht, H., and Horn, A. H. C. (2014). The conformational stability of nonfibrillar amyloid- β peptide oligomers critically depends on the C-terminal peptide length. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 161–167. doi:10.1021/cn400208r.

- Song, D. K., Won, M. H., Jung, J. S., Lee, J. C., Kang, T. C., Suh, H. W., et al. (1998). Behavioral and neuropathologic changes induced by central injection of carboxyl-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein in mice. *J. Neurochem.* 71, 875–878. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71020875.x.
- Song, J., and Kim, O. Y. (2018). Perspectives in Lipocalin-2: Emerging Biomarker for Medical Diagnosis and Prognosis for Alzheimer's Disease. *Clin. Nutr. Res.* 7, 1–10. doi:10.7762/cnr.2018.7.1.1.
- Song, W. M., and Colonna, M. (2018). The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat. Immunol.* 19, 1048–1058. doi:10.1038/s41590-018-0212-1.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Sontag, J.-M., Diaz-Arrastia, R., Ogris, E., Dayal, S., et al. (2007). Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2751–2759. doi:10.1523/JNEUROSCI.3316-06.2007.
- Sontag, J.-M., and Sontag, E. (2014). Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnmol.2014.00016.
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., et al. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS One* 5, e9505. doi:10.1371/journal.pone.0009505.
- Sotiropoulos, I., Galas, M.-C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., et al. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 91. doi:10.1186/s40478-017-0489-6.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49–60. doi:10.1038/nrn1007.
- Souchet, B., Audrain, M., Billard, J. M., Dairou, J., Fol, R., Orefice, N. S., et al. (2019). Inhibition of DYRK1A proteolysis modifies its kinase specificity and rescues Alzheimer phenotype in APP/PS1 mice. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 46. doi:10.1186/s40478-019-0678-6.
- Spanos, F., and Liddelow, S. A. (2020). An Overview of Astrocyte Responses in Genetically Induced Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cells* 9, 2415. doi:10.3390/cells9112415.
- Sperber, B. R., Leight, S., Goedert, M., and Lee, V. M. (1995). Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci. Lett.* 197, 149–153. doi:10.1016/0304-3940(95)11902-9.
- Sperling, R. A., Jack, C. R., and Aisen, P. S. (2011). Testing the right target and right drug at the right stage. *Sci. Transl. Med.* 3, 111cm33. doi:10.1126/scitranslmed.3002609.

- Sperling, R. A., Laviolette, P. S., O'Keefe, K., O'Brien, J., Rentz, D. M., Pihlajamaki, M., et al. (2009). Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron* 63, 178–188. doi:10.1016/j.neuron.2009.07.003.
- Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M. J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., et al. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e9979. doi:10.1371/journal.pone.0009979.
- St George-Hyslop, P. H. (2000). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 47, 183–199. doi:10.1016/s0006-3223(99)00301-7.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* 156, 1051–1063. doi:10.1083/jcb.200108057.
- Stanga, S., Zanou, N., Audouard, E., Tasiaux, B., Contino, S., Vandermeulen, G., et al. (2016). APP-dependent glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression drives neuromuscular junction formation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30, 1696–1711. doi:10.1096/fj.15-278739.
- Stöhr, J., Watts, J. C., Mensinger, Z. L., Oehler, A., Grillo, S. K., DeArmond, S. J., et al. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11025–11030. doi:10.1073/pnas.1206555109.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., et al. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977–1981. doi:10.1073/pnas.90.5.1977.
- Sugimoto, I., Futakawa, S., Oka, R., Ogawa, K., Marth, J. D., Miyoshi, E., et al. (2007). Beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase I cleavage by BACE1 enhances the sialylation of soluble glycoproteins. A novel regulatory mechanism for alpha2,6-sialylation. *J. Biol. Chem.* 282, 34896–34903. doi:10.1074/jbc.M704766200.
- Suh, Y.-H., and Checler, F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* 54, 469–525. doi:10.1124/pr.54.3.469.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégar, S., Loyens, A., Talahari, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575. doi:10.1074/jbc.M110.199976.

- Sun, X., He, G., and Song, W. (2006). BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1369–1376. doi:10.1096/fj.05-5632com.
- Suzuki, T., and Okumura-Noji, K. (1995). NMDA receptor subunits epsilon 1 (NR2A) and epsilon 2 (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated from the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 582–588. doi:10.1006/bbrc.1995.2662.
- Szczepanik, A. M., Rampe, D., and Ringheim, G. E. (2001). Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 77, 304–317. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00240.x.
- Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M., and Haapasalo, A. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. 14.
- Takashima, A. (2006). GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 309–317. doi:10.3233/jad-2006-9s335.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., et al. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438–441. doi:10.1038/nature01506.
- Takeda, S. (2019). Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors. *Neurosci. Res.* 141, 36–42. doi:10.1016/j.neures.2018.08.005.
- Takeda, T. (2009). Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochem. Res.* 34, 639–659. doi:10.1007/s11064-009-9922-y.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.* 150, 989–1000. doi:10.1083/jcb.150.5.989.
- Takeuchi, I. K., and Takeuchi, Y. K. (2001). Transient accumulation of Gallyas-Braak-positive and phosphorylated tau-immunopositive substances in neuronal lipofuscin granules in the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex of rats during long-term chloroquine intoxication. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 102, 191–194. doi:10.1007/s004010100360.
- Taleski, G., Schuhmacher, D., Su, H., Sontag, J.-M., and Sontag, E. (2021a). Disturbances in PP2A methylation and one-carbon metabolism compromise Fyn distribution, neuritogenesis and APP regulation. *J. Biol. Chem.*, 100237. doi:10.1074/jbc.RA120.016069.

- Taleski, G., Schuhmacher, D., Su, H., Sontag, J.-M., and Sontag, E. (2021b). Disturbances in PP2A methylation and one-carbon metabolism compromise Fyn distribution, neuritogenesis, and APP regulation. *J. Biol. Chem.* 296, 100237. doi:10.1074/jbc.RA120.016069.
- Tam, J. H., Seah, C., and Pasternak, S. H. (2014). The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid. *Mol. Brain* 7, 54. doi:10.1186/s13041-014-0054-1.
- Tamayev, R., Matsuda, S., Arancio, O., and D'Adamio, L. (2012). β - but not γ -secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia. *EMBO Mol. Med.* 4, 171–179. doi:10.1002/emmm.201100195.
- Tan, J. M. M., Wong, E. S. P., Kirkpatrick, D. S., Pletnikova, O., Ko, H. S., Tay, S.-P., et al. (2008). Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 17, 431–439. doi:10.1093/hmg/ddm320.
- Tanaka, H., Katoh, A., Oguro, K., Shimazaki, K., Gomi, H., Itohara, S., et al. (2002). Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 67, 11–20. doi:10.1002/jnr.10004.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., et al. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880–884. doi:10.1126/science.2949367.
- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F., and Neve, R. L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528–530. doi:10.1038/331528a0.
- Tapia-Rojas, C., Cabezas-Opazo, F., Deaton, C. A., Vergara, E. H., Johnson, G. V. W., and Quintanilla, R. A. (2019). It's all about tau. *Prog. Neurobiol.* 175, 54–76. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.12.005.
- Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S.-K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., et al. (2009). Cerebrospinal Fluid β -Amyloid 42 and Tau Proteins as Biomarkers of Alzheimer-Type Pathologic Changes in the Brain. *Arch. Neurol.* 66. doi:10.1001/archneurol.2008.596.
- Tardivel, M., Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., et al. (2016). Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 117. doi:10.1186/s40478-016-0386-4.

- Tautou, M., Eddarkaoui, S., Descamps, F., Larchanché, P.-E., El Bakali, J., Goveas, L. M., et al. (2021). A β -Secretase Modulator Decreases Tau Pathology and Preserves Short-Term Memory in a Mouse Model of Neurofibrillary Degeneration. *Front. Pharmacol.* 12, 679335. doi:10.3389/fphar.2021.679335.
- Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R., et al. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol. Dis.* 31, 250–260. doi:10.1016/j.nbd.2008.04.011.
- Tennstaedt, A., Pöpsel, S., Truebestein, L., Hauske, P., Brockmann, A., Schmidt, N., et al. (2012). Human High Temperature Requirement Serine Protease A1 (HTRA1) Degrades Tau Protein Aggregates. *J. Biol. Chem.* 287, 20931–20941. doi:10.1074/jbc.M111.316232.
- Tenreiro, S., Eckermann, K., and Outeiro, T. F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front. Mol. Neurosci.* 7, 42. doi:10.3389/fnmol.2014.00042.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., et al. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580. doi:10.1002/ana.410300410.
- Terwel, D., Muyllaert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H., et al. (2008). Amyloid Activates GSK-3 β to Aggravate Neuronal Tauopathy in Bigenic Mice. *Am. J. Pathol.* 172, 786–798. doi:10.2353/ajpath.2008.070904.
- Tesseur, I., Van Dorpe, J., Spittaels, K., Van den Haute, C., Moechars, D., and Van Leuven, F. (2000). Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 156, 951–964. doi:10.1016/S0002-9440(10)64963-2.
- Tezuka, T., Umemori, H., Akiyama, T., Nakanishi, S., and Yamamoto, T. (1999). PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 435–440. doi:10.1073/pnas.96.2.435.
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800. doi:10.1212/wnl.58.12.1791.
- Theunis, C., Crespo-Biel, N., Gafner, V., Pihlgren, M., López-Deber, M. P., Reis, P., et al. (2013). Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy. *PLoS ONE* 8, e72301. doi:10.1371/journal.pone.0072301.
- Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.513.

- Tian, Y., Bustos, V., Flajolet, M., and Greengard, P. (2011). A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 1934–1942. doi:10.1096/fj.10-175158.
- Toh, W. H., Chia, P. Z. C., Hossain, M. I., and Gleeson, P. A. (2018). GGA1 regulates signal-dependent sorting of BACE1 to recycling endosomes, which moderates A β production. *Mol. Biol. Cell* 29, 191–208. doi:10.1091/mbc.E17-05-0270.
- Toh, W. H., and Gleeson, P. A. (2016). Dysregulation of intracellular trafficking and endosomal sorting in Alzheimer's disease: controversies and unanswered questions. *Biochem. J.* 473, 1977–1993. doi:10.1042/BCJ20160147.
- Tolia, A., and De Strooper, B. (2009). Structure and function of gamma-secretase. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 211–218. doi:10.1016/j.semcdb.2008.10.007.
- Tolnay, M., Sergeant, N., Ghestem, A., Chalbot, S., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., et al. (2002). Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 104, 425–434. doi:10.1007/s00401-002-0591-z.
- Tomiyama, T., Matsuyama, S., Iso, H., Umeda, T., Takuma, H., Ohnishi, K., 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. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 4845–4856. doi:10.1523/JNEUROSCI.5825-09.2010.
- Trejo-Lopez, J. A., Sorrentino, Z. A., Riffe, C. J., Prokop, S., Dickson, D. W., Yachnis, A. T., et al. (2020). Generation and Characterization of Novel Monoclonal Antibodies Targeting p62/sequestosome-1 Across Human Neurodegenerative Diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 79, 407–418. doi:10.1093/jnen/nlaa007.
- Trepanier, C. H., Jackson, M. F., and MacDonald, J. F. (2012). Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS J.* 279, 12–19. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08391.x.
- Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M., and LaFerla, F. M. (2008). Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol. Aging* 29, 1607–1618. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014.
- Turner, R. S., Hebron, M. L., Lawler, A., Mundel, E. E., Yusuf, N., Starr, J. N., et al. (2020). Nilotinib Effects on Safety, Tolerability, and Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol.* 88, 183–194. doi:10.1002/ana.25775.

- Tyan, S.-H., Shih, A. Y.-J., Walsh, J. J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., et al. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell. Neurosci.* 51, 43–52. doi:10.1016/j.mcn.2012.07.009.
- Um, J. W., Nygaard, H. B., Heiss, J. K., Kostylev, M. A., Stagi, M., Vortmeyer, A., et al. (2012). Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 1227–1235. doi:10.1038/nn.3178.
- Usenovic, M., Niroomand, S., Drolet, R. E., Yao, L., Gaspar, R. C., Hatcher, N. G., et al. (2015). Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 14234–14250. doi:10.1523/JNEUROSCI.1523-15.2015.
- Uytterhoeven, V., Lauwers, E., Maes, I., Miskiewicz, K., Melo, M. N., Swerts, J., et al. (2015). Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* 88, 735–748. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.012.
- Van Broeckhoven, C., Haan, J., Bakker, E., Hardy, J. A., Van Hul, W., Wehnert, A., et al. (1990). Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science* 248, 1120–1122. doi:10.1126/science.1971458.
- Van der Jeugd, A., Vermaercke, B., Derisbourg, M., Lo, A. C., Hamdane, M., Blum, D., et al. (2013). Progressive Age-Related Cognitive Decline in Tau Mice. *J. Alzheimers Dis.* 37, 777–788. doi:10.3233/JAD-130110.
- van der Kant, R., and Goldstein, L. S. B. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev. Cell* 32, 502–515. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.022.
- Vasconcelos, B., Stancu, I.-C., Buist, A., Bird, M., Wang, P., Vanoosthuyse, A., et al. (2016). Heterotypic seeding of Tau fibrillization by pre-aggregated Abeta provides potent seeds for prion-like seeding and propagation of Tau-pathology in vivo. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 549–569. doi:10.1007/s00401-015-1525-x.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741. doi:10.1126/science.286.5440.735.
- Vassar, R., and Citron, M. (2000). Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* 27, 419–422. doi:10.1016/s0896-6273(00)00051-9.

- Vassar, R., Kuhn, P.-H., Haass, C., Kennedy, M. E., Rajendran, L., Wong, P. C., et al. (2014). Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J. Neurochem.* 130, 4–28. doi:10.1111/jnc.12715.
- Vautheny, A., Duwat, C., Aurégan, G., Joséphine, C., Hérard, A.-S., Jan, C., et al. (2021). THY-Tau22 mouse model accumulates more tauopathy at late stage of the disease in response to microglia deactivation through TREM2 deficiency. *Neurobiol. Dis.* 155, 105398. doi:10.1016/j.nbd.2021.105398.
- Vazquez-Martin, A., López-Bonet, E., Cufí, S., Oliveras-Ferraro, C., Del Barco, S., Martin-Castillo, B., et al. (2011). Repositioning chloroquine and metformin to eliminate cancer stem cell traits in pre-malignant lesions. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 14, 212–223. doi:10.1016/j.drug.2011.04.003.
- Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., et al. (2000). Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 1657–1665.
- Vemuri, P., Lesnick, T. G., Przybelski, S. A., Knopman, D. S., Lowe, V. J., Graff-Radford, J., et al. (2017). Age, vascular health, and Alzheimer disease biomarkers in an elderly sample. *Ann. Neurol.* 82, 706–718. doi:10.1002/ana.25071.
- Verberk, I. M. W., Thijssen, E., Koelewijn, J., Mauroo, K., Vanbrabant, J., de Wilde, A., et al. (2020). Combination of plasma amyloid beta(1-42/1-40) and glial fibrillary acidic protein strongly associates with cerebral amyloid pathology. *Alzheimers Res. Ther.* 12, 118. doi:10.1186/s13195-020-00682-7.
- Vergara, C., Houben, S., Suain, V., Yilmaz, Z., De Decker, R., Vanden Dries, V., et al. (2019). Amyloid- β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 137, 397–412. doi:10.1007/s00401-018-1953-5.
- Verma, M., Vats, A., and Taneja, V. (2015). Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 18, 138–145. doi:10.4103/0972-2327.144284.
- Vermersch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M. M., Hofmann-Radvanyi, H., Watzet, A., Petit, H., et al. (1996). Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 47, 711–717. doi:10.1212/wnl.47.3.711.
- Verny, M., Jellinger, K. A., Hauw, J.-J., Bancher, C., Litvan, I., and Agid, Y. (1996). Progressive supranuclear palsy: a clinicopathological study of 21 cases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 91, 427–431. doi:10.1007/s004010050446.

- Vetrivel, K. S., and Thinakaran, G. (2006). Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66, S69–73. doi:10.1212/01.wnl.0000192107.17175.39.
- Villasante, A., Corces, V. G., Manso-Martínez, R., and Avila, J. (1981). Binding of microtubule protein to DNA and chromatin: possibility of simultaneous linkage of microtubule to nucleic acid and assembly of the microtubule structure. *Nucleic Acids Res.* 9, 895–908. doi:10.1093/nar/9.4.895.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Bégard, S., Loyens, A., Delacourte, A., Beauvillain, J.-C., et al. (2007a). Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol. Dis.* 25, 686–696. doi:10.1016/j.nbd.2006.09.019.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gelé, P., Drobeck, H., Bégard, S., et al. (2007b). Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J. Biol. Chem.* 282, 18197–18205. doi:10.1074/jbc.M609475200.
- Vingtdeux, V., Sergeant, N., and Buée, L. (2012). Potential Contribution of Exosomes to the Prion-Like Propagation of Lesions in Alzheimer's Disease. *Front. Physiol.* 3. doi:10.3389/fphys.2012.00229.
- Vinuesa, A., Pomilio, C., Gregosa, A., Bentivegna, M., Presa, J., Bellotto, M., et al. (2021). Inflammation and Insulin Resistance as Risk Factors and Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 15, 653651. doi:10.3389/fnins.2021.653651.
- Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Tardivel, M., Chouala, M. S., Sultan, A., et al. (2015). Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol. Dis.* 82, 540–551. doi:10.1016/j.nbd.2015.09.003.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fncel.2014.00084.
- Vogel, J. W., Iturria-Medina, Y., Strandberg, O. T., Smith, R., Levitis, E., Evans, A. C., et al. (2020). Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 11, 2612. doi:10.1038/s41467-020-15701-2.
- von Arnim, C. A. F., Kinoshita, A., Peltan, I. D., Tangredi, M. M., Herl, L., Lee, B. M., et al. (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J. Biol. Chem.* 280, 17777–17785. doi:10.1074/jbc.M414248200.

- von Arnim, C. A. F., Spoelgen, R., Peltan, I. D., Deng, M., Courchesne, S., Koker, M., et al. (2006). GGA1 Acts as a Spatial Switch Altering Amyloid Precursor Protein Trafficking and Processing. *J. Neurosci.* 26, 9913–9922. doi:10.1523/JNEUROSCI.2290-06.2006.
- von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., et al. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18, 661–669. doi:10.1016/s0197-4580(97)00151-6.
- Vossel, K. A., Xu, J. C., Fomenko, V., Miyamoto, T., Suberbielle, E., Knox, J. A., et al. (2015). Tau reduction prevents A β -induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3 β . *J. Cell Biol.* 209, 419–433. doi:10.1083/jcb.201407065.
- Vossel, K. A., Zhang, K., Brodbeck, J., Daub, A. C., Sharma, P., Finkbeiner, S., et al. (2010). Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science* 330, 198. doi:10.1126/science.1194653.
- Wahle, T., Prager, K., Raffler, N., Haass, C., Famulok, M., and Walter, J. (2005). GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 453–461. doi:10.1016/j.mcn.2005.03.014.
- Wahle, T., Thal, D. R., Sastre, M., Rentmeister, A., Bogdanovic, N., Famulok, M., et al. (2006). GGA1 Is Expressed in the Human Brain and Affects the Generation of Amyloid -Peptide. *J. Neurosci.* 26, 12838–12846. doi:10.1523/JNEUROSCI.1982-06.2006.
- Walls, K. C., Ager, R. R., Vasilevko, V., Cheng, D., Medeiros, R., and LaFerla, F. M. (2014). p-Tau immunotherapy reduces soluble and insoluble tau in aged 3xTg-AD mice. *Neurosci. Lett.* 575, 96–100. doi:10.1016/j.neulet.2014.05.047.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., et al. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539. doi:10.1038/416535a.
- Walsh, D. M., and Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* 101, 1172–1184. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x.
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., et al. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 276, 14634–14641. doi:10.1074/jbc.M011116200.
- Walter, J., and Haass, C. (2000). Posttranslational modifications of amyloid precursor protein: ectodomain phosphorylation and sulfation. *Methods Mol. Med.* 32, 149–168. doi:10.1385/1-59259-195-7:149.

- Wang, C., Najm, R., Xu, Q., Jeong, D.-E., Walker, D., Balestra, M. E., et al. (2018). Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nat. Med.* 24, 647–657. doi:10.1038/s41591-018-0004-z.
- Wang, H., Sang, N., Zhang, C., Raghupathi, R., Tanzi, R. E., and Saunders, A. (2015). Cathepsin L Mediates the Degradation of Novel APP C-Terminal Fragments. *Biochemistry* 54, 2806–2816. doi:10.1021/acs.biochem.5b00329.
- Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2007a). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 25, 59–68. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.-D., et al. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1219–1225. doi:10.1523/JNEUROSCI.4660-04.2005.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., and Sisodia, S. S. (1996). The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 271, 31894–31902. doi:10.1074/jbc.271.50.31894.
- Wang, R., Ying, Z., Zhao, J., Zhang, Y., Wang, R., Lu, H., et al. (2012). Lys(203) and Lys(382) are essential for the proteasomal degradation of BACE1. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 606–615. doi:10.2174/156720512800618026.
- Wang, S., Simon, B. P., Bennett, D. A., Schneider, J. A., Malter, J. S., and Wang, D.-S. (2007b). The significance of Pin1 in the development of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 11, 13–23. doi:10.3233/jad-2007-11105.
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., and Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1842, 1240–1247. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.015.
- Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., et al. (2017). The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol. Neurodegener.* 12, 5. doi:10.1186/s13024-016-0143-y.
- Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 5–21. doi:10.1038/nrn.2015.1.
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Krüger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.-M., et al. (2009a). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4153–4170. doi:10.1093/hmg/ddp367.

- Wang, Y., Zhang, X., Song, Q., Hou, Y., Liu, J., Sun, Y., et al. (2020). Characterization of the chromatin accessibility in an Alzheimer's disease (AD) mouse model. *Alzheimers Res. Ther.* 12, 29. doi:10.1186/s13195-020-00598-2.
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., et al. (2009b). Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10788–10801. doi:10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009.
- Watts, J. C., Condello, C., Stöhr, J., Oehler, A., Lee, J., DeArmond, S. J., et al. (2014). Serial propagation of distinct strains of A β prions from Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10323–10328. doi:10.1073/pnas.1408900111.
- Watts, J. C., and Prusiner, S. B. (2018). β -Amyloid Prions and the Pathobiology of Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8, a023507. doi:10.1101/cshperspect.a023507.
- Wei, H., Zhang, H., Wang, X., Xie, J., An, D., Wan, L., et al. (2020). Direct Activation of Protein Phosphatase 2A (PP2A) by Tricyclic Sulfonamides Ameliorates Alzheimer's Disease Pathogenesis in Cell and Animal Models. *Neurotherapeutics* 17, 1087–1103. doi:10.1007/s13311-020-00841-6.
- Wei, M.-L., and Andreadis, A. (2002). Splicing of a Regulated Exon Reveals Additional Complexity in the Axonal Microtubule-Associated Protein Tau. *J. Neurochem.* 70, 1346–1356. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70041346.x.
- Wei, W., Norton, D. D., Wang, X., and Kusiak, J. W. (2002). Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain J. Neurol.* 125, 2036–2043. doi:10.1093/brain/awf205.
- Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Reinhard, F. B., Schuckert, O., Evin, G., et al. (1999). Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases. *J. Biol. Chem.* 274, 5823–5829. doi:10.1074/jbc.274.9.5823.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 1858–1862. doi:10.1073/pnas.72.5.1858.
- Weyer, S. W., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., et al. (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J.* 30, 2266–2280. doi:10.1038/emboj.2011.119.
- Weyer, S. W., Zagrebelsky, M., Herrmann, U., Hick, M., Ganss, L., Gobbert, J., et al. (2014). Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APP α expression. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 36. doi:10.1186/2051-5960-2-36.

- Wijesekera, N., Gonçalves, R. A., Ahrens, R., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2018). Tau ablation in mice leads to pancreatic β cell dysfunction and glucose intolerance. *FASEB J.* 32, 3166–3173. doi:10.1096/fj.201701352.
- Wilcock, G. K., Black, S. E., Hendrix, S. B., Zavitz, K. H., Swabb, E. A., and Laughlin, M. A. (2008). Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial. *Lancet Neurol.* 7, 483–493. doi:10.1016/S1474-4422(08)70090-5.
- Willem, M., Dewachter, I., Smyth, N., Dooren, T. V., Borghgraef, P., and Haass, C. (2004). α -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Increases Amyloid Deposition in Brain Parenchyma but Reduces Cerebrovascular Amyloid Angiopathy in Aging BACE $\times$ APP[V717I] Double-Transgenic Mice. 165, 11.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., et al. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664–666. doi:10.1126/science.1132341.
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., et al. (2015). η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526, 443–447. doi:10.1038/nature14864.
- Winblad, B., Graf, A., Riviere, M.-E., Andreasen, N., and Ryan, J. (2014). Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 6, 7. doi:10.1186/alzrt237.
- Wischik, C. M., Harrington, C. R., and Storey, J. M. D. (2014). Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 529–539. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.008.
- Wolfe, D. M., Lee, J.-H., Kumar, A., Lee, S., Orenstein, S. J., and Nixon, R. A. (2013). Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1949–1961. doi:10.1111/ejn.12169.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513–517. doi:10.1038/19077.
- Wolozin, B., Bacic, M., Merrill, M. J., Lesch, K. P., Chen, C., Lebovics, R. S., et al. (1992). Differential expression of carboxyl terminal derivatives of amyloid precursor protein among cell lines. *J. Neurosci. Res.* 33, 163–169. doi:10.1002/jnr.490330121.
- Wong, D. F., Rosenberg, P. B., Zhou, Y., Kumar, A., Raymont, V., Ravert, H. T., et al. (2010). In vivo imaging of amyloid deposition in Alzheimer disease using the radioligand 18F-AV-45 (florbetapir [corrected] F 18). *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 51, 913–920. doi:10.2967/jnumed.109.069088.

- Wong, H.-K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., et al. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 280, 23009–23017. doi:10.1074/jbc.M414648200.
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., et al. (2001). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* 355, 609–615. doi:10.1042/bj3550609.
- Wu, T., Dejanovic, B., Gandham, V. D., Gogineni, A., Edmonds, R., Schauer, S., et al. (2019). Complement C3 Is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy. *Cell Rep.* 28, 2111–2123.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.060.
- Wu, Y., Zhang, S., Xu, Q., Zou, H., Zhou, W., Cai, F., et al. (2016). Regulation of global gene expression and cell proliferation by APP. *Sci. Rep.* 6, 22460. doi:10.1038/srep22460.
- Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* 12, 1005–1015. doi:10.1038/nm1484.
- Xie, H. Q., and Johnson, G. V. (1998). Calcineurin inhibition prevents calpain-mediated proteolysis of tau in differentiated PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 53, 153–164. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19980715)53:2<153::AID-JNR4>3.0.CO;2-6.
- Xie, Z., and Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109. doi:10.1038/ncb1007-1102.
- Yahiaoui, S., Hamidouche, K., Ballandonne, C., Davis, A., de Oliveira Santos, J. S., Freret, T., et al. (2016). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) partial agonist and 5-HT6R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 121, 283–293. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.048.
- Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., et al. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J. Exp. Med.* 211, 387–393. doi:10.1084/jem.20131685.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* 23, 33–42. doi:10.1247/csf.23.33.

- Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R. J., Cirrito, J. R., et al. (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J. Biol. Chem.* 281, 24566–24574. doi:10.1074/jbc.M602440200.
- Yan, R. (2017). Physiological Functions of the β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 97. doi:10.3389/fnmol.2017.00097.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., et al. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537. doi:10.1038/990107.
- Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P., and Xu, H. (2001). The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J. Biol. Chem.* 276, 36788–36796. doi:10.1074/jbc.M104350200.
- Yan, R., and Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol.* 13, 319–329. doi:10.1016/S1474-4422(13)70276-X.
- Yanamandra, K., Jiang, H., Mahan, T. E., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., et al. (2015). Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 278–288. doi:10.1002/acn3.176.
- Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., et al. (2013). Anti-Tau Antibodies that Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition In Vivo. *Neuron* 80, 402–414. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.046.
- Yang, D.-S., Stavrides, P., Mohan, P. S., Kaushik, S., Kumar, A., Ohno, M., et al. (2011). Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain J. Neurol.* 134, 258–277. doi:10.1093/brain/awq341.
- Yang, G., Liu, H., Ma, D.-L., and Leung, C.-H. (2019). Rebalancing metal dyshomeostasis for Alzheimer's disease therapy. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 24, 1159–1170. doi:10.1007/s00775-019-01712-y.
- Yang, L.-B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.-L., et al. (2003). Elevated β -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* 9, 3–4. doi:10.1038/nm0103-3.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K., and Kirschner, D. A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279–282. doi:10.1126/science.2218531.

- Yarchoan, M., Toledo, J. B., Lee, E. B., Arvanitakis, Z., Kazi, H., Han, L.-Y., et al. (2014). Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 679–689. doi:10.1007/s00401-014-1328-5.
- Ye, L., Fritsch, S. K., Schelle, J., Obermüller, U., Degenhardt, K., Kaeser, S. A., et al. (2015). Persistence of A β seeds in APP null mouse brain. *Nat. Neurosci.* 18, 1559–1561. doi:10.1038/nn.4117.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257–263. doi:10.1016/0378-1119(90)90310-N.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., et al. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.010.
- Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., and Selkoe, D. J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 14459–14469. doi:10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007.
- Young-Pearse, T. L., Chen, A. C., Chang, R., Marquez, C., and Selkoe, D. J. (2008). Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin β 1. *Neural Develop.* 3, 15. doi:10.1186/1749-8104-3-15.
- Younkin, S. G. (1998). The role of A β 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris* 92, 289–292. doi:10.1016/s0928-4257(98)80035-1.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48–54. doi:10.1038/35024009.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., and Nixon, R. A. (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 1682–1687. doi:10.1523/JNEUROSCI.5242-07.2008.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., et al. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6391–6410. doi:10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2010). A β oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 11938–11950. doi:10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010.

- Zetterberg, H. (2017). Review: Tau in biofluids - relation to pathology, imaging and clinical features. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 194–199. doi:10.1111/nan.12378.
- Zetterberg, H., and Bendlin, B. B. (2020). Biomarkers for Alzheimer's disease—preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol. Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-020-0721-9.
- Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.-G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelevnikov, A. A., et al. (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* 153, 707–720. doi:10.1016/j.cell.2013.03.030.
- Zhang, W., Falcon, B., Murzin, A. G., Fan, J., Crowther, R. A., Goedert, M., et al. (2019). Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases. *eLife* 8, e43584. doi:10.7554/eLife.43584.
- Zhang, X., Li, Y., Xu, H., and Zhang, Y. (2014). The γ -secretase complex: from structure to function. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fncel.2014.00427.
- Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Su Kang, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., et al. (2015). Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 6, 8762. doi:10.1038/ncomms9762.
- Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., et al. (2007). Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3639–3649. doi:10.1523/JNEUROSCI.4396-06.2007.
- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., et al. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023–1031.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.031.
- Zheng, J., Akbari, M., Schirmer, C., Reynaert, M.-L., Loyens, A., Lefebvre, B., et al. (2020). Hippocampal tau oligomerization early in tau pathology coincides with a transient alteration of mitochondrial homeostasis and DNA repair in a mouse model of tauopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* 8, 25. doi:10.1186/s40478-020-00896-8.
- Zhi, P., Chia, P. Z. C., Chia, C., and Gleeson, P. A. (2011). Intracellular trafficking of the β -secretase and processing of amyloid precursor protein. *IUBMB Life* 63, 721–729. doi:10.1002/iub.512.
- Zhou, L., Barão, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijssen, H., et al. (2012). The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *J. Biol. Chem.* 287, 25927–25940. doi:10.1074/jbc.M112.377465.

- Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Van Deerlin, V. M., Bruce, J., Shuck, T., Grossman, M., et al. (2001). Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* 49, 165–175. doi:10.1002/1531-8249(20010201)49:2<165::aid-ana36>3.0.co;2-3.
- Zott, B., Busche, M. A., Sperling, R. A., and Konnerth, A. (2018). What Happens with the Circuit in Alzheimer's Disease in Mice and Humans? *Annu. Rev. Neurosci.* 41, 277–297. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061725.
- Zou, C., Crux, S., Marinesco, S., Montagna, E., Sgobio, C., Shi, Y., et al. (2016). Amyloid precursor protein maintains constitutive and adaptive plasticity of dendritic spines in adult brain by regulating D-serine homeostasis. *EMBO J.* 35, 2213–2222. doi:10.15252/emboj.201694085.

Annexes

Publications

Brevet "POLYAMINO BIARYL COMPOUNDS AND THEIR USE", Carato P, Descamps F, El Bakali J, Evrard C, Gay M, Melnyk P, Renault N, Sergeant N, Vingtdeux V, Tautou M., Brevet international publié le 16 janvier 2020 sous le n° WO2020011848A1.

Tautou M, Eddarkaoui S, Descamps F, Larchanché PE, El Bakali J, Goveas LM, Dumoulin M, Lamarre C, Blum D, Buée L, Melnyk P, Sergeant N. A β -Secrétase Modulator Decreases Tau Pathology and Preserves Short-Term Memory in a Mouse Model of Neurofibrillary Degeneration. *Front Pharmacol.* 2021 Jun 29;12:679335. doi: 10.3389/fphar.2021.679335. PMID: 34267657; PMCID: PMC8276176. Article publié le 29 juin 2021 dans *Frontiers in Pharmacology* (Impact factor : 5,8 – Cite score : 6,2).

Valorisation des résultats

- Poster "Recherche du mode d'action de molécules anti-Alzheimer sur une nouvelle cible pharmacologique" présenté au 2e Congrès des 7 CoEN - Centers of Excellence in Neurodegeneration (14 et 15 novembre 2019, Lille)
- Poster et Flash Talk "New compounds targeting amyloid and Tau pathologies in Alzheimer's disease" présentés au Congrès France Alzheimer (19 et 20 novembre 2019, Paris)
- Présentation orale et poster "Searching for the mechanism of action of anti-Alzheimer molecules on a new pharmacological target" au Drug Discovery Day 2019-2020 (17 décembre 2019, Lille) – Obtention d'un prix Meilleure conférence
- Poster "A novel β -secrétase modulator efficient against both amyloid and Tau pathologies in Alzheimer's disease" présenté au congrès Alzheimer's Association International Conference (AAIC) Neuroscience Next (9 et 10 novembre 2020, virtuel)

- 2 Posters “ β -secrétase modulators with a dual activity against both amyloid and Tau pathologies” et “Multi-effects molecules with a novel pharmacological target: an indirect β -secrétase inhibitor for the treatment of A β lesions in Alzheimer’s disease” présentés au congrès Advances in Alzheimer’s and Parkinson’s Therapies – ADPD (9 au 14 mars 2021, virtuel)
- Poster "Reducing amyloid pathology and neuroinflammation in APPSwe/PSEN1dE9 mice with a non-competitive β -secrétase inhibitor“ présenté au congrès NeuroFrance 2021 (19 au 21 mai 2021, virtuel).

WB– Primary antibodies	Species	Dilution	Saturation	Reference
Pan-Tau Nter	Rabbit	1 : 5000	TNT / 5% milk	Homemade 12-41 1242075
Pan-Tau Cter	Rabbit	1 : 4000	TNT / 5% milk	Homemade 993-S2 Y16L-2P [427-441]
§262	Rabbit	1 : 5000	TNT / 5% BSA	Invitrogen 44750G
§396	Rabbit	1 : 10 000	TNT / 5% BSA	Invitrogen 44752G
§422	Mouse	1 : 1000	TNT / 5% BSA	4BDX-1501
τ212-§214 (AT100)	Mouse	1 : 1000	TNT, no saturation	Invitrogen MN1060
Unphospho Tau 198-204 (TAU-1)	Mouse	1 : 2000	TNT / 5% milk	Millipore MAB3420
GAPDH	Rabbit	1 : 50 000	TNT / 5% milk	Sigma G9545
PP2A _c subunit	Rabbit	1 : 1000	TNT / 5% milk	Sigma 07-324
LC3B	Rabbit	1 : 2000	TNT / 5% BSA	Cell Signaling 2775S
SQSTM1/p62	Rabbit	1 : 1000	TNT / 5% milk	Cell Signaling 5114S
Demethyl PP2A _c (4B7)	Mouse	1 : 500	TNT / 5% BSA	SantaCruz sc13601
mTOR (7C10)	Rabbit	1 : 1000	TNT / 5% BSA	Cell Signaling 2983S
Phospho mTOR (§2448)	Rabbit	1 : 1000	TNT / 5% BSA	Cell Signaling 5538S
p70S6K (H-9)	Mouse	1 : 500	TNT / 5% BSA	SantaCruz sc8418
Phospho p70S6K (τ389)	Rabbit	1 : 1000	TNT / 5% BSA	Cell Signaling 9205S
BACE1	Rabbit	1 : 5000	TNT / 5% BSA	Merck Millipore AB5940
APP-C17	Rabbit	1 : 7500	TNT / 5% milk	Homemade 100354 2071
Connexin 43	Rabbit	1 : 1000	TNT / 5% milk	Life 710700
WB– Secondary antibodies				
Goat anti-Rabbit	Goat	1 : 5000		Vector PI1000
Goat anti-Mouse	Goat	1 : 50 000		Merck Millipore AP200P
IHC – Primary antibodies				
§202-τ205 (AT8)	Mouse	1 : 500		Thermo Scientific MN1020
τ212-§214 (AT100)	Mouse	1 : 500		Invitrogen MN1060
§396-§404 (AD2)	Mouse	1 : 4		Homemade
§422	Rabbit	1 : 1000		Homemade 98857
GFAP (visible)	Rabbit	1 : 1000		Dako, Z0334
GFAP (fluorescence)	Mouse	1 : 200		SantaCruz sc33673
IHC – Secondary antibodies				
Goat anti-Mouse IgG biotinylated	Goat	1 : 400		Vector ZF0805
Goat anti-Rabbit IgG biotinylated	Goat	1 : 400		Vector BA-1000
Alexa Fluor 568 goat anti-Mouse	Goat	1 : 1000		Invitrogen A11004
Alexa Fluor 488 goat anti-Rabbit	Goat	1 : 1000		Invitrogen A11008

Annexe 1 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western-blot et l'immunohistochimie dans l'étude sur les THY-Tau22. L'espèce dans laquelle les anticorps ont été développés, la dilution, la solution de saturation et les références des prestataires sont indiqués.

Name	Species	Dilution	Buffer	Reference
Western Blot – Detection antibodies				
GAPDH	Rabbit	1 : 50 000	TNT/5% milk	Sigma G9545
PP2A_C subunit	Rabbit	1 : 1000	TNT/5% milk	Sigma 07-324
APP-C17	Rabbit	1 : 7500	TNT/5% milk	Homemade 100354 2071
PhosphoAPP (pThr668)	Rabbit	1 : 2000	TNT/5% milk	Homemade
GFAP	Rabbit	1 : 10000	TNT/5% milk	Sigma G9269
6E10	Mouse	1 : 1000	TNT/5% milk	Biologend 803001
CDK5 (J3)	Mouse	1 : 500	TNT/5% BSA	SantaCruz sc6247
GGA1 (3F11)	Mouse	1 : 500	TNT/5% BSA	Sigma-Aldrich WH0026088M1
GSK3-β (Y216)	Rabbit	1 : 1000	TNT/5% BSA	SantaCruz sc135653
BACE1	Rabbit	1 : 5000	TNT/5% BSA	Merck Millipore AB5940
L1-CAM	Rabbit	1 : 500	TNT/5% BSA	Merck Millipore ABT143
NRG1 (D11)	Rabbit	1 : 1000	TNT/5% BSA	Sigma-Aldrich MABN42
LC3B	Rabbit	1 : 2000	TNT/5% BSA	Cell signaling 2775S
p62/SQSTM1	Rabbit	1 : 1000	TNT/5% milk	Cell signaling 5114S
Fyn (H-80)	Rabbit	1 : 1000	TNT/5% milk	SantaCruz sc2879
Total Tau (C-ter)	Rabbit	1 : 4000	TNT/5% milk	Homemade 993S1
Western Blot – Revelation antibodies				
Goat anti-Rabbit	Goat	1 : 5000		Vector PI1000
Goat anti-Mouse	Goat	1 : 50 000		Merck Millipore AP200P
Immunohistochemistry – Primary antibodies				
Biotin anti β-amyloid 17-24 (4G8)	Mouse	1 : 1000		Biologend SIG-39240
GFAP	Rabbit	1 : 1000		Dako, Z0334
Immunohistochemistry – Secondary antibodies				
Alexa Fluor 568 goat anti-Rabbit	Goat	1 : 1000		Invitrogen A11011
Anti-rabbit biotinylated	Goat	1 : 400		Vector BA-1000

Annexe 2 : **Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western-blot et l'immunohistochimie dans l'étude sur les APP/PS1.** L'espèce dans laquelle les anticorps ont été développés, la dilution, la solution de saturation et les références des prestataires sont indiqués.



A β -Secretase Modulator Decreases Tau Pathology and Preserves Short-Term Memory in a Mouse Model of Neurofibrillary Degeneration

Marie Tautou¹, Sabiha Eddarkaoui^{1,2}, Florian Descamps¹, Paul-Emmanuel Larchanché¹, Jamal El Bakali¹, Liesel Mary Goveas¹, Mélanie Dumoulin¹, Chloé Lamarre¹, David Blum^{1,2}, Luc Buée^{1,2}, Patricia Melnyk^{1*} and Nicolas Sergeant^{1,2*}

¹Inserm, CHU Lille, U1172–LiNCog–Lille Neuroscience and Cognition, University of Lille, Lille, France, ²Alzheimer and Tauopathies, LabEx DISTALZ, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Arjan Blokland,
Maastricht University, Netherlands

Reviewed by:

Veronika Brezovakova,
Institute of Neuroimmunology (SAS),
Slovakia
Nadia Mazzaro,
Telethon Institute of Genetics and
Medicine (TIGEM), Italy

*Correspondence:

Nicolas Sergeant
nicolas.sergeant@inserm.fr
Patricia Melnyk
patricia.melnik@univ-lille.fr

[†]These authors share the last
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 11 March 2021

Accepted: 18 May 2021

Published: 29 June 2021

Citation:

Tautou M, Eddarkaoui S, Descamps F,
Larchanché P-E, El Bakali J,
Goveas LM, Dumoulin M, Lamarre C,
Blum D, Buée L, Melnyk P and
Sergeant N (2021) A β -Secretase
Modulator Decreases Tau Pathology
and Preserves Short-Term Memory in
a Mouse Model of
Neurofibrillary Degeneration.
Front. Pharmacol. 12:679335.
doi: 10.3389/fphar.2021.679335

Identifying which among several *in cellulo* pharmacological activities is necessary for the proper *in vivo* activity is essential for further drug development against Alzheimer's disease pathophysiological processes. An in-depth structure–activity relationship–based study has been carried out, and two molecules, named MAGS02-14 and PEL24-199, that share a β -secretase modulatory effect associated or not to a lysosomotropic activity in cellulo have been identified. In terms of chemical formulas, MAGS02-14 and PEL24-199 only differ from each other by a single nitrogen atom. The study aimed to elucidate the *in vivo* pharmacological effects of lysosomotropic and/or the β -secretase modulatory activity in a tau pathology mouse model. To address this question, the THY-Tau22 transgenic model of tauopathy was treated with both compounds for 6 weeks in a curative paradigm. Short-term memory, tau burden, and inflammatory processes were analyzed using orthogonal methods, and PEL24-199, but not MAGS02-14, was shown to restore the short-term memory and reduce the neurofibrillary degenerating process. These effects were associated with a reduced phosphorylation of tau, an increased phosphatase expression, and decreased astrogliosis. Our results, therefore, suggest that the lysosomotropic activity may be nonessential for the effect on tau pathology.

Keywords: Alzheimer's disease, BACE protein, lysosomes, proteostasis, tauopathy, tau pathology

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease defined by the presence of two neuropathological brain lesions: intraneuronal aggregates of tau proteins and extracellular deposition of toxic A β peptides, respectively, referred to as tau and amyloid pathologies. A β peptides are generated by sequential cleavages of the amyloid precursor protein (APP). The β -secretase (BACE1) endoprotease catalyzes the first N-terminal cleavage followed by a second γ -secretase endoproteolytic C-terminal cleavage of A β peptides (for a review, see Müller et al., 2017). Tau pathology corresponds to the progressive accumulation and aggregation of abnormally and hyperphosphorylated isoforms of the microtubule-associated protein tau, *in fine* forming the so-called neurofibrillary tangles (NFTs) (Buée et al., 2000; Liu et al., 2012; Gao et al., 2018). The neuropathological lesions and cognitive impairments are a primary specific criterion to the definition and diagnosis of AD, suggesting that the pathophysiological processes underlying the development

of these lesions are tightly linked to the disease and distinguish AD from other neurodegenerative diseases.

An accumulating body of evidence suggests that APP metabolism regulates tau expression *via* the inhibition of β -secretase which reduces intracellular tau protein. The cellular protein homeostasis systems that are regulated by autophagy and the endosome/lysosome pathways may lie at the crossroads of APP and tau metabolism. (Bourdenx et al., 2021). These degradation systems play a central role in removing misfolded proteins (Frake et al., 2015). Perturbed trafficking of lysosomal vesicles and enzymes, and the intravesicular accumulation of substrates are characteristics of lysosomal storage disorders. Several other such dysfunctions of the lysosomal system that further implicate a dysfunction of the proteostasis systems (Nixon and Yang, 2011; Piras et al., 2016) have been reported in AD and tauopathies. The autophagic flow leading to autophagosome formation through the fusion of autophagosomes with lysosomes is a key process that can be blocked by lysosomotropic agents such as chloroquine (Tam et al., 2014; Mauthe et al., 2018).

We previously described molecules having a chloroquinoline nucleus substituted with an N, N'-disubstituted piperazine moiety. This family of molecules acts on the autophagic/endolysosomal systems, some of which were shown to be effective against both amyloid and tau pathologies *in vitro* and *in vivo* (Melnyk et al., 2015; Sergeant et al., 2019). A ligand-based approach enabled us to determine a pharmacophore and synthesize multiple compounds with different scaffolds derived from this pharmacophore (Gay et al., 2018). Among these new compounds, two differ by a single nitrogen atom [MAGS02-14 compound 30 in Gay et al. (2018)] substituted by a carbon atom at the same position for PEL24-199 [compound 31 in Gay et al. (2018)]. Although having a different chemical structure, MAGS02-14 exhibits a lysosomotropic activity comparable to chloroquine and a β -secretase non competitive inhibitory activity *in cellulo*. In contrast, PEL24-199 only has a non competitive β -secretase inhibitory activity with a strongly reduced lysosomotropic activity. The MAGS02-14-treated cells also exhibit swelling of the intracellular vesicles and accumulation of LC3 and p62 markers indicative of an autophagy flux inhibition. Expression and localization of these markers are not modified by PEL24-199 treatment, while $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ production is reduced in both MAGS02-14 and PEL24-199 (Gay et al., 2018). This autophagic flux inhibition of MAGS02-14 and the absence of lysosomotropic activity for PEL24-199 can then be associated with a shared β -secretase non competitive inhibiting effect *in cellulo*.

Modulation of APP metabolism using either β - or γ -secretase inhibitors regulates the dosage of tau protein in human-derived cerebral cortical neurons (Moore et al., 2015). Moreover, we previously demonstrated that molecules used for the scaffold design of MAGS02-14 and PEL24-199 showed efficacy to reduce both amyloid and tau pathologies *in vivo* in a preventive paradigm (Sergeant et al., 2019). This study has been carried out to investigate whether MAGS02-14 and/or PEL24-199 could reverse the tau pathology through an *in vivo* study on a mouse model of

hippocampal NFTs. Through this study, we aimed to identify which among the lysosomotropic or β -secretase modulatory activity is pivotal to the improvement of the cognitive function and associated tau pathology.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In this study, we used females THY-Tau22 transgenic and wild-type (WT) littermates (C57Bl/6J genetic background), obtained by crossing THY-Tau22 heterozygous males (C57Bl/6J) with WT females. All animals were housed in a pathogen-free facility with a 12/12 h light-dark cycle and maintained under a constant temperature of 22°C at five to six animals per cage (Tecniplast Cages 1284L). Animals were fed with *ad libitum* access to food and water as in compliance with European standards for the care, and use of laboratory animals and experimentations conducted in this study were authorized by the French Direction of Veterinary Services with the approved registration number APAFIS#10392-201706231206250v4.

Drug Treatments

PEL24-199 and MAGS02-14 compounds were synthesized as previously described (Gay et al., 2018). A safety pilot study was performed in WT animals treated for one month to establish the innocuousness of compounds MAGS02-14 and PEL24-199 at a dose of 1 and 5 mg/kg. Following the treatment of WT animals, PEL 24-199 and MAGS02-14 were measured in the brain tissue (**Supplementary Figure S1**). For the present study, animals ($n = 10$ per condition) were randomly distributed, and THY-Tau22 and WT mice were treated for 6 weeks, starting at 6 months of age. MAGS02-14 or PEL24-199 treatment was delivered in the drinking water at a final concentration of 1 mg/kg, that is, 12.5 μ g/ml for drinking solutions considering an average weight of 25 g/mouse drinking 4 ml per day. Drinking bottles were changed once every week as aqueous solutions of compounds MAGS02-14 and PEL24-99 were previously demonstrated to be stable during more than 1 week. The volume of solution consumed by the mice was measured throughout the treatment period.

Behavioral Tests

Anxiety

All behavioral procedures were performed blind to the treatment administered. Anxiety, which could interfere with a memory test, was assessed in treated and untreated animals using the elevated plus maze test (EPM). Mice were placed in the center of a plus-shaped maze consisting of two 10-cm-wide open arms and two 10-cm-wide enclosed arms elevated at 50 cm above the floor. Parameters including distance moved, velocity, the number of entries into each arm, time spent in the open vs. the closed arms, and percentage of open arms entries were acquired during 5 min by video recording using EthoVision video tracking equipment and software (Noldus Information Technology, Paris, France) in a dedicated room.

Short-Term Spatial Memory

Short-term spatial memory was assessed using the Y-maze task. The Y-maze task consists of three 10-cm-wide enclosed arms surrounded by four spatial cues. One of the two arms opposite to the starting (S) arm was alternatively closed during the learning phase. Each mouse ($n = 10$ mice per group) was positioned in the starting arm and was free to explore the maze for 5 min. Then during the retention phase of 2 min, the mouse was returned to the home cage. During the test phase of 5 min, the closed arm was opened, and the mouse was placed in the starting arm. The closed arm was then named the “New arm” (N), and the two other arms were named “Others” (O). Parameters—total distance traveled, velocity, the alternation between the arms, and entries into the three arms—were measured during 5 min. The short-term spatial memory test was considered successful when the proportion of entries in the new arm was significantly higher than the time spent in the other two arms during the first 2 min of the test.

Sacrifice and Brain Tissue Preparation

The mice were sacrificed by beheading in order to prevent an influence of anesthetization (Le Freche et al., 2012). The blood was collected from the neck in heparinized tubes. For immunohistochemistry, one hemibrain was immersed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for a week at 4°C and transferred to 20% sucrose solution overnight before being frozen. Cortex and hippocampus of the other half of the brain were dissected, with each split in 1.5 ml isopropylene tubes, and snap-frozen by immersion of the tubes in isopropanol solution added with dry ice. Brain tissues were then stored at -80°C until biochemical analyses. For biochemical analyses, cortex and hippocampus were thawed on ice, and were then added with a volume of ice-cooled Tris-sucrose buffer (TSB) (Tris-HCl 410 mM, pH 7.4 added with 10% sucrose) to reach a final volume of 200 μL . Brain tissue homogenates were further sonicated (40 pulses of 0.5 s, amplitude 40%, 20 kHz) on ice. Protein concentrations were determined using the BCA Protein Dosage Kit (BioRad, France).

Insoluble Tau Fraction Preparation

Brain tissue homogenates in TSB buffer (crude) were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min (Centrifuge 5424R, Eppendorf). The supernatant (S1) was added with TSB to a final volume of 600 μL and sonicated (40 pulses of 0.5 s, amplitude 40%, 20 kHz). The brain tissue homogenates were then spun at 49,000 rpm for 1 h (Optima TLX ultracentrifuge equipped with a TLA-110 rotor, Beckman). The supernatant was collected, and a pellet was resuspended in 600 μL of a Tris-Triton (2%) solution (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, 2% Triton X-100) (S2). The S2 samples were sonicated and spun at 49,000 rpm for 1 h. The resulting S3 supernatant was recovered, and the pellet (C3) was resuspended in one volume of NuPAGE™ LDS 2X Sample Buffer supplemented with NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. The NUPAGE™ Western blot protocol was applied, and 8 μL of crude, 10 μL of S1, 15 μL of S2 and S3, and 20 μL of C3 were loaded per well. Western blot signals were acquired using the LAS-3000 (Fuji), and protein expression levels were determined

using ImageQuantTL software. Results ($n = 4$ per group of animals) were expressed as the ratio of the protein in the insoluble fraction divided by the protein signal detected in the soluble fraction plus that measured in the insoluble fraction.

Bioavailability Assessment

Analyte Mouse Brain Extraction

Fifty mg of brain tissue (2 mice per group) were thawed in a safe lock microtube with 500 μL of 1% HCl with one 5 mm tungsten carbide bead. The microtubes were loaded in the TissueLyser II (Qiagen) support plates (24×2) at 80°C during 2×5 min at 25 Hz (between two cycles, 180 plate rotation). The tubes were centrifuged at 12,000 rpm (Centrifuge 5424R, Eppendorf) for 10 min at 4°C . The supernatant (200 μL) was placed in a polypropylene tube, and 1800 μL of acetonitrile containing the internal standard (Verapamil 1 nM) at -20°C was added. Each tube was stirred for 30 s and placed for 1 h at -20°C for protein precipitation. The tubes were centrifuged at 4,000 tr/min (Centrifuge 5424R, Eppendorf) for 10 min at 4°C . 1.8 ml from each tube was withdrawn and transferred to another tube for evaporation using the Genevac™ centrifugal evaporator for 4 h at 30°C . The residue was dissolved with 200 μL of acetonitrile, vigorously stirred, and evaporated in Genevac™ centrifugal evaporator for 1 h at 30°C . The final residue was dissolved with 90 μL of methanol, vigorously stirred, filtrated, and placed in a Matrix tube for mass spectrometry.

Analytical Equipment

LC-MS/MS analysis was performed with an Acquity UPLC-MS Waters I-Class coupled to a Xevo TQS Mass Spectrometer (Waters®). Instrument control, data acquisition, and processing were made by MassLynx™ software, and the reprocessing was carried out using MassLynx™ sub-software (TargetLynx). The separation was carried out on a Waters® Acquity BEH [C18, 50×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$ (40°C)]. 1 μL of the sample was injected, and elution was performed at a constant flow rate of 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ with H_2O -ammonium formate 5 mM (pH 3.75) as eluent A and acetonitrile-ammonium formate (5 mM, 5% H_2O) as eluent B, employing a 0.1-min step at 2% B and a linear gradient from 2% B to 98% B in 1.9 min, followed by a 0.5 min step at 98% B. Then, column re-equilibration was achieved after 1.5 min. MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5000 V. The nebulizer (air) and the curtain (argon) gas flows were set at 0.5 bar. The source temperature and the cone gas flow were set at 150°C and 50 L/h, respectively. The desolvation temperature and desolvation gas flow were set at 600°C and 1200 L/h, respectively. The multiple reaction monitoring (MRM) transitions were monitored with the following values: PEL24-199: 478.40/125.98; MAGS02-14: 479.40/112.04; and Verapamil (internal standard): 455.32/165.04. The collision energies were 42 eV (PEL24-199), 46 eV (MAGS02-14), and 56 eV (Verapamil) for all these transitions.

SDS-PAGE and Western Blot

Hippocampus and cortex samples were prepared at a final concentration of 1 mg/ml of total brain lysate protein in TSB with NuPAGE™ LDS 2X Sample Buffer supplemented with

NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10x), following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Brain homogenates were then heated for 10 min at 70°C. For each LDS brain lysate, 8 µg of total brain protein were loaded per well onto precast 12% Criterion™ XT Bis-Tris polyacrylamide 26-well gels (Bio-Rad) to analyze tau phosphorylation. The 4–12% Criterion™ XT Bis-Tris polyacrylamide 18-well gels were used for all other Western blot analyses. Criterion™ Cell and the NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (1X) were used. Electrophoreses were achieved by applying a continued tension of 100 V per gel for 60 min. The apparent molecular weight calibration was determined using molecular weight markers (Novex and Magic Marks, Life Technologies). Following electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane of 0.4 µm pore size (GE Healthcare) using the Criterion™ blotting system by applying a continued tension of 100 V for 40 min. Quality of electrophoresis and protein transfer was determined by a reversible Ponceau Red coloration of protein transferred onto the nitrocellulose membrane (0.2% xylydine Ponceau 2R and 3% trichloroacetic acid). After extensive washing under deionized water, membranes were blocked during 1 h in 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (v/v) (TBS-T) with 5% (w/v) of skimmed milk (TBS-M), or 5% (w/v) of bovine serum albumin (TBS-BSA) (see **Supplementary Table S1**). Membranes were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Conditions of use of primary and secondary antibodies are summarized in **Supplementary Table S1**. Membranes were rinsed 3 times for 10 min with TBS-T, and then incubated with secondary antibodies for 45 min at room temperature. The immunoreactive complexes were revealed using either the ECL™ or ECL™ Prime (Cytiva), following the manufacturer's instructions, and Western blot images and signals were acquired with the LAS-3000 system (Fuji). Quantifications of protein expression were calculated with ImageQuant™ TL software, and values for each sample were divided by the values of GAPDH staining. The semi-quantitative results for samples of the treated conditions were divided by the semi-quantitative values of the control samples to express the results as the percentage of the untreated condition. An average of six to seven mice per group was analyzed for this experiment.

Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis of tau protein was performed as described (Sergeant et al., 2017). Briefly, 15 µg of total brain proteins (pool of five mice for each group) were added with 15 µl of Tris 20 mM containing 2% SDS and heat-treated at 100°C for 5 min. Proteins were then precipitated with 10 volumes of cold acetone (−20°C), incubated at −20°C for 20 min, and centrifuged at 14,000 × g for 10 min. The supernatants were removed, and the protein pellets were left to dry for 1 h at room temperature before being resuspended in 200 µl of IEF buffer (8 M urea, 2 M thiourea, and 4% CHAPS). Samples were sonicated (40 pulses of 0.5 s, amplitude 40%, 20 kHz) on ice, and each tube was added with 2D electrophoresis buffer (1.1 µl of IPG buffer pH 3–11), 2.2 µl of DeStreak Rehydration Solution (Cytiva), and a

bromophenol blue trace. Then samples were loaded on 11 cm Cytiva (pH 3–11) IPG strips covered with mineral oil and left to rehydrate passively overnight. The IPG strips were then charged in an Ettan™ IPGphor™ Manifold (Cytiva), and isoelectrofocalization was achieved by applying 0.5 kV for 1 h, 1 kV for 1 h, and 6 kV for 2 h (for each experiment, samples are processed in the same run of IEF). The IPG strips were then equilibrated three times (10 min each) in an equilibration buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM DTT, 10% glycerol, 5% SDS, and 0.05% bromophenol blue) and were layered onto a Criterion XT 4–12% precast gradient Bis-Tris Polyacrylamide Gel. SDS-PAGE was performed according to the regular Western blot protocol. Tau protein isoforms were detected with the Pan anti-tau Cter antibody (**Supplementary Table S1**).

Immunohistochemistry and Image Analysis

Coronal free-floating brain sections of 40 µm were obtained with a cryostat (CM3050 S, Leica). The sections of the hippocampus were selected according to the stereological rules and were stored in PBS (phosphate buffer saline) with 0.2% sodium azide at 4°C. For visible phospho-tau and GFAP immunohistochemistry, the coronal brain sections were permeabilized with a 0.2% Triton X-100 solution in PBS. Sections were then incubated with a 0.3% hydrogen peroxide solution and further blocked with 10% “Mouse on Mouse” Kit serum (ZFO513, Vector Laboratories) for 1 h before incubation with primary anti-tau or anti-GFAP antibody overnight at 4°C. Antibodies used in this study are listed in **Supplementary Table S1**. After washing in PBS, the sections were incubated with biotinylated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody for 1 h. Then sections were incubated with the ABC Kit (Vector Laboratories) for 2 h and developed using DAB (Sigma) before being rinsed with a physiological solution. Brain sections were mounted on glass slides (Superfrost Plus, ThermoScientific) and dehydrated by sequential baths in 30, 70, 95, and 100% ethanol for 5 min. Then the slides were immersed in toluene for 15 min and fixed with mounting medium (VectaMount Permanent Mounting Medium H-5000, Vector Laboratories) and glass coverslips. Images were acquired using Zeiss Axioscan. Z1 slidescan, and quantification of the NFT-containing neurons was performed by counting the number of events in the CA1 area of the hippocampus, for three anteroposterior sections in mean selected according to the Allen mouse brain atlas in an average of four mice for each group.

For immunofluorescence studies, coronal brain sections were permeabilized with an 0.2% Triton X-100 solution in PBS and blocked with normal goat serum (1/100; S1000 Vector Laboratories) in PBS for 1 h before incubation with an anti-GFAP antibody and anti- τ_{422} at 4°C overnight. After washes, sections were incubated with secondary antibody AlexaFluor 568 goat anti-mouse IgG and AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG in 0.2% Triton X-100 in PBS for 1 h. Sections were incubated with DAPI (1/5000; Sigma-Aldrich) for 5 min and mounted on glass slides. Sections were finally treated with 0.3% Sudan Black

(Millipore 2,160) for 5 min and washed with 70% ethanol to block autofluorescence. Images were acquired using a Fluorescence Zeiss Axioscan. Z1 slidescan. Quantification of GFAP staining and τ 422 were performed using NIH ImageJ software and a custom macro. The number of NFT-containing neurons marked by τ 422 phospho-tau antibody and the surface of GFAP staining is expressed as a ratio over the section brain surface (in mm²) analyzed, and was determined in the hippocampus of THY-Tau22 mice.

ELISA Measurements

The blood samples in heparinized tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 15 min (Centrifuge 5424R, Eppendorf), and the plasma was recovered. Plasma levels of total human tau protein were obtained using an ELISA kit (Total Tau ELISA, EuroImmun, EQ6531-9601-L), following the manufacturer's instructions. Briefly, 100 μ l of biotin solution per well were incubated with 25 μ l of samples, calibrators, and controls during 3 h at room temperature. The ELISA plate was washed using the washing buffer, and 100 μ l per well of enzyme conjugate was added for 30 min. The wells were washed again, and 100 μ l per well of chromogen/substrate were incubated for 30 min protected from light. 100 μ l of stop solution were added per well, and the absorbance at 450 nm was measured with Multiskan Ascent spectrophotometer plate reader (ThermoLab Systems). The amounts of total tau in the plasma were assessed in six mice per condition by referring to the standard curve of the manufacturer and expressed in pg/mL.

Statistics

Results are expressed as means $\pm$ SEM. Differences between mean values were determined using the Student's *t*-test or a Mann-Whitney U-test using GraphPad Prism software 8.4.2. *p* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

PEL24-199 Treatment Restores the Short-Term Memory Deficits in a Mouse Model of Tau Pathology

Although NFTs are observed in the hippocampus of THY-Tau22, cognitive impairment appears to be moderate before 6 months of age (Carvalho et al., 2019). The pathology strengthens at 7 months, a stage at which THY-Tau22 mice exhibit spatial memory impairments and ongoing tau pathology development (Sergeant et al., 2019). The associated spatial memory deficits then worsen over time to reach a maximum of 10 months (Schindowski et al., 2006; Van der Jeugd et al., 2013). In order to compare the *in vivo* effects of PEL24-199 and MAGS02-14 (Figure 1A), global behavioral and short-term spatial memory tests were carried out at 7 months of age, following the 6 weeks of treatment in a curative paradigm (Figure 1B). The anxiety measured using the elevated plus maze test showed no significant impact of

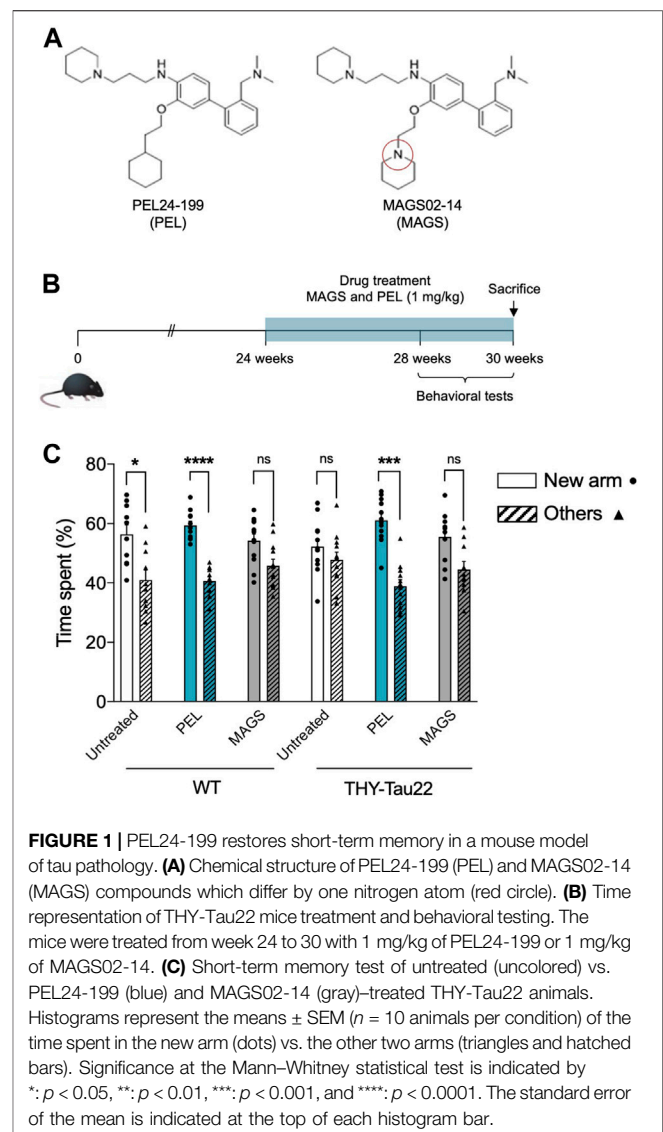


FIGURE 1 | PEL24-199 restores short-term memory in a mouse model of tau pathology. **(A)** Chemical structure of PEL24-199 (PEL) and MAGS02-14 (MAGS) compounds which differ by one nitrogen atom (red circle). **(B)** Time representation of THY-Tau22 mice treatment and behavioral testing. The mice were treated from week 24 to 30 with 1 mg/kg of PEL24-199 or 1 mg/kg of MAGS02-14. **(C)** Short-term memory test of untreated (uncolored) vs. PEL24-199 (blue) and MAGS02-14 (gray)-treated THY-Tau22 animals. Histograms represent the means $\pm$ SEM ($n = 10$ animals per condition) of the time spent in the new arm (dots) vs. the other two arms (triangles and hatched bars). Significance at the Mann-Whitney statistical test is indicated by *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, and ****: $p < 0.0001$. The standard error of the mean is indicated at the top of each histogram bar.

PEL24-199 and MAGS02-14 treatments on velocity, average distance moved, or percentage of time spent in the closed or open arms for either WT or THY-Tau22 mice ($n = 10$ animals per group; $p = 0.53$, **Supplementary Figure S2**). Thus, the treatments did not significantly affect the basal anxiety behavior of both WT and THY-Tau22 mice, suggesting that short-term spatial memory assays following the treatments were not influenced by cognitive deficits. In the short-memory Y-maze task, 7 months WT mice treated at 1 mg/kg with MAGS02-14 spent less time in the new arm than the untreated WT mice (Figure 1C). At the same dose, PEL24-199 did not alter the performance of the WT mice. At 7 months of age, THY-Tau22 mice exhibited a short-term spatial memory impairment with an absence of preference between the new arm and the others. MAGS02-14 treatment had no significant effect on the spatial memory of THY-Tau22 mice. In contrast, PEL24-199 mitigated memory impairments of THY-Tau22 mice (Figure 1C).

PEL24-199 Decreases Hyperphosphorylated Tau in Mice Brain Extracts

Cognitive impairment is associated with a progression of the tau pathology in the hippocampus and the cortex of THY-Tau22 mice (Van der Jeugd et al., 2013). Thus, memory impairment could therefore be related to a modification of the tau pathology and tau phosphorylation status. We, assessed the hippocampal and cortical tau expression as well as the tau phosphorylation levels using antibodies raised against N- and C-terminus of tau proteins, and specific phospho-sites are known to be hyperphosphorylated in AD (Augustinack et al., 2002; for a review, see Sergeant et al., 2008) as well as pathological epitopes which are only detected when neurofibrillary processes are present ($\tau_{212/\text{s}214}$ and $\text{s}422$) (antibody epitopes are represented on **Figure 2A**). Treatment with PEL24-199 or MAGS02-14 did not change the global expression of total tau proteins either in the hippocampus cortex of THY-Tau22 mice (**Figure 2B**, pan-Tau antibodies). Tau phosphorylation at either physiologic or pathological epitopes was not significantly diminished, except for phosphorylation at serine 262 (**Figure 2C**) following MAGS02-14 treatment (**Figures 2B,C**). Noticeably, PEL24-199 decreased the level of phosphorylated tau at $\text{s}396$ and $\text{s}262$ and significantly diminished the labeling of pathological epitopes $\tau_{212/\text{s}214}$ and $\text{s}422$ in the cortex by half (**Figures 2B,C**). Further, PEL24-199 significantly reduced the phosphorylation of tau at $\text{s}262$, $\text{s}396$, and $\text{s}422$ sites, and $\tau_{212/\text{s}214}$ phospho-sites; however, it was not statistically significant ($p = 0.0625$) in the hippocampus of THY-Tau22-treated mice (**Figure 2C**). Levels of unphosphorylated tau at 198-204 amino acid sequence did not change under PEL24-199 or MAGS treatments. Global phosphorylation status was then analyzed by 2D gel electrophoresis and labeling of tau with the pan-Tau Cter antibody. Phosphorylated isovariants are resolved toward the acidic isoelectric points of 2D gels. Reduced intensity of those acidic isovariants was observed in the cortex and hippocampus of THY-Tau22 mice treated with PEL24-199 and MAGS02-14 when compared to untreated THY-Tau22 mice (**Figure 2D**, isovariants comprised the dotted lines and were indicated by arrowheads). As tau phosphorylation is controlled by phosphatases and kinases, expression of the principal tau serine/threonine phosphatase PP2A (Liu et al., 2005) was investigated. On treatment with MAGS02-14 (**Figure 2E**) as well as in the cortex for PEL24-199-treated mice (**Figure 2E**), the catalytic subunit PP2A_C expression remained unchanged. However, we noticed a sharp increase of PP2A_C expression in the hippocampus of THY-Tau22 mice treated with PEL24-199 (**Figure 2E**). Methylation or demethylation of the catalytic subunit of PP2A_C at leucine 309 residue reflects its phosphatase activity, where methylated PP2A_C corresponds to the activated form of the phosphatase (Papon et al., 2013; Sontag and Sontag 2014; Ahmed et al., 2020). The ratio of demethylated PP2A_C showed no significant modification between untreated and treated animals, suggesting an unchanged activity (**Figure 2E**).

PEL24-199 Decreases Detergent-Resistant Phospho-Tau in Mice Hippocampus

NFTs are characterized by tau aggregation of hyper- and abnormally phosphorylated tau proteins. This aggregation is associated with an increased insolubility of tau (Schindowski et al., 2006). Tau solubility was further investigated in soluble and insoluble tau fractions (Sergeant et al., 2003) from THY-Tau22 mice treated with either MAGS02-14 or PEL24-199. MAGS02-14 treatment unchanged the distribution of tau or phosphorylated tau at serine 396 either in soluble or insoluble protein fractions (**Supplementary Figure S3**), whereas total tau and phosphorylated tau at serin 396 were reduced in most insoluble C3 fraction from brain tissue of mice treated with PEL24-199 (**Figures 3B–D**). The unphosphorylated tau proteins remained unchanged in this same insoluble fraction (C3) (**Figures 3B–E**). Therefore, while MAGS02-14 at 1 mg/ml did not affect tau insolubility, PEL24-199 diminished both total tau and phospho-Tau insolubility in THY-Tau22-treated animals.

PEL24-199 Reduces NFTs and Astrogliosis in the Hippocampus of THY-Tau22 Treated Animals

THY-Tau22 mice exhibit neurofibrillary tangles as well as mild astrogliosis (Schindowski et al., 2006). To further assess the modulatory effect of our compounds, the burden of NFTs in the hippocampal CA1 was investigated by immunohistochemistry using antibodies against hyperphosphorylated tau epitopes $\text{s}202/\tau_{205}$ and $\text{s}396/404$ and pathological tau phospho-sites $\tau_{212/\text{s}214}$ (**Figure 4A**). Treatment with MAGS02-14 resulted in a slight, although not significant, reduction in the number of NFTs. (**Supplementary Figure S4A**). In PEL24-199 THY-Tau22-treated animals, $\text{s}202/\tau_{205}$ and $\text{s}396/\text{s}404$ -positive NFTs were significantly reduced (**Figure 4B**). The number of NFTs stained with pathological $\tau_{212/\text{s}214}$ phospho-Tau antibody was reduced, although not significantly ($p = 0.0952$). Noticeably, we observed a significant reduction of NFTs stained by the $\text{s}422$ phospho-Tau antibody by immunofluorescence, further demonstrating that PEL24-199 treatment reduced the tau pathology (**Figure 4F**).

Astroglial activation is activated with the development of tau pathology (Schindowski et al., 2006; Laurent et al., 2017; Laurent et al., 2018) and presumably favors the development of tau pathology (Laurent et al., 2018; Ising et al., 2019). We therefore further investigated the impact of PEL24-199 and MAGS02-14 treatment on astrocytes activation, both by immunohistochemistry and immunofluorescence. MAGS02-14 treatment did not modify the GFAP-positive astrocytes as well as the number of $\text{s}422$ -positive NFTs (**Supplementary Figures S4C–E**). THY-Tau22 PEL24-199-treated animals showed a significant reduction of GFAP-positive astrocytes both by immunohistochemistry and immunofluorescence (**Figure 4G**). This decrease in GFAP staining was associated with limited

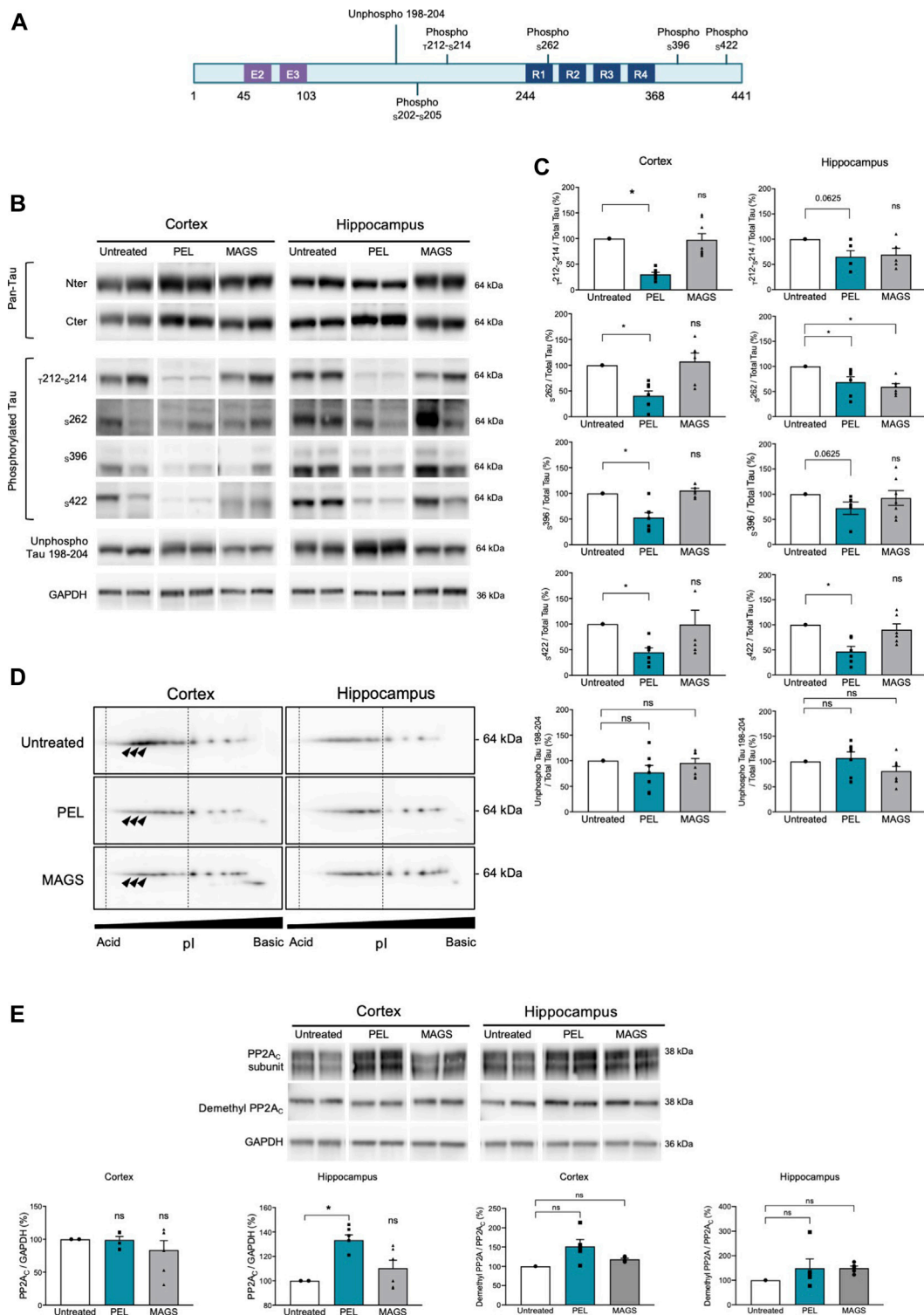


FIGURE 2 | PEL24-199 decreases hyper and pathological tau phosphorylation and increases PP2A_c expression. **(A)** Positioning of unphospho- or phosphorylated epitopes recognized by tau antibodies (numbering according to the longest human brain tau isoform of 441 amino acids). Exon two and exon three encoding sequence and the microtubule-binding region formed by tau repeated sequences numbered R1 to R4 are represented. **(B)** Western blotting of tau expression using N-terminus (Nter) and C-terminus (Cter) pan-Tau antibodies, and phosphorylated tau at threonine 212 and serine 214 (τ 212- τ 214), serine 262 (τ 262), serine 396 (τ 396), serine 422 (τ 422), and unphosphorylated tau residues comprised in tau sequence 198-204 (unphospho Tau 198-204). Antibodies labeling are presented for untreated, PEL, and MAGS-treated animals for protein extracts from the cortex or the hippocampus. **(C)** Histogram representations of the % of antibodies labeling. The control (Continued)

FIGURE 2 | percentages (untreated conditions, uncolored bars) were given the value of 100%. PEL (blue bars) and MAGS (gray bars) means $\pm$ SEM percentages to the control value are represented. Significance at the Mann–Whitney test is indicated *: $p < 0.05$. **(D)** Two-dimensional gel electrophoresis and Western blotting of human tau isovariants from the cortex or hippocampus from untreated, PEL, or MAGS-treated animals. Acido-basic (pI) orientation of 2D Western blots is indicated on the x-axis, and tau protein apparent molecular weight of 64 kDa is indicated on the y-axis. The vertical dotted lines encompass the most acidic tau isovariant, and differences are indicated by arrowheads. Note that tau isovariants extend toward more acidic isoelectric points in hippocampal THY-Tau22 brain extracts from untreated animals. Two-dimensional electrophoresis is representative of a pool of five animals per condition. **(E)** Western blots of PP2A catalytic subunit C (PP2A_C), demethyl PP2A_C, and GAPDH, and histogram representations of the semiquantitative analysis of phosphatase PP2A_C catalytic subunit in cortex and hippocampus of untreated (value of 100%), PEL, and MAGS-treated THY-Tau22 animals. Histograms of the ratio of demethyl PP2A_C upon total PP2A_C expression are expressed as the percentage of the untreated condition which was given the value of 100%.

modification of connexin43 expression, a major gap junction protein of astrocytes (**Supplementary Figure S5**).

PEL24-199 or MAGS02-14 Does Not Modify Autophagy in THY-Tau22-Treated Animals

In vitro, MAGS02-14 but not PEL24-199 was shown to increase the expression of autophagy markers such as p62 or LC3, whereas both molecules are non-competitive inhibitors of the β -secretase. We, therefore, analyzed the expression of APP and BACE1 as well as several markers of autophagia. APP and BACE1 expression were not modified by either PEL24-199 or MAGS02-14 treatments (**Supplementary Figure S6**). Expression of LC3 or p62 remains unchanged in treated conditions as compared to the untreated THY-Tau22 mice (**Supplementary Figure S7**). Moreover, both mTOR and its downstream target p70S6 kinase expression and phosphorylation (p70S6K) were not modified consequently to MAGS02-14 or PEL24-199 treatments of THY-Tau22 animals, together suggesting that autophagy was not part of the signaling cascade modulated by our drugs.

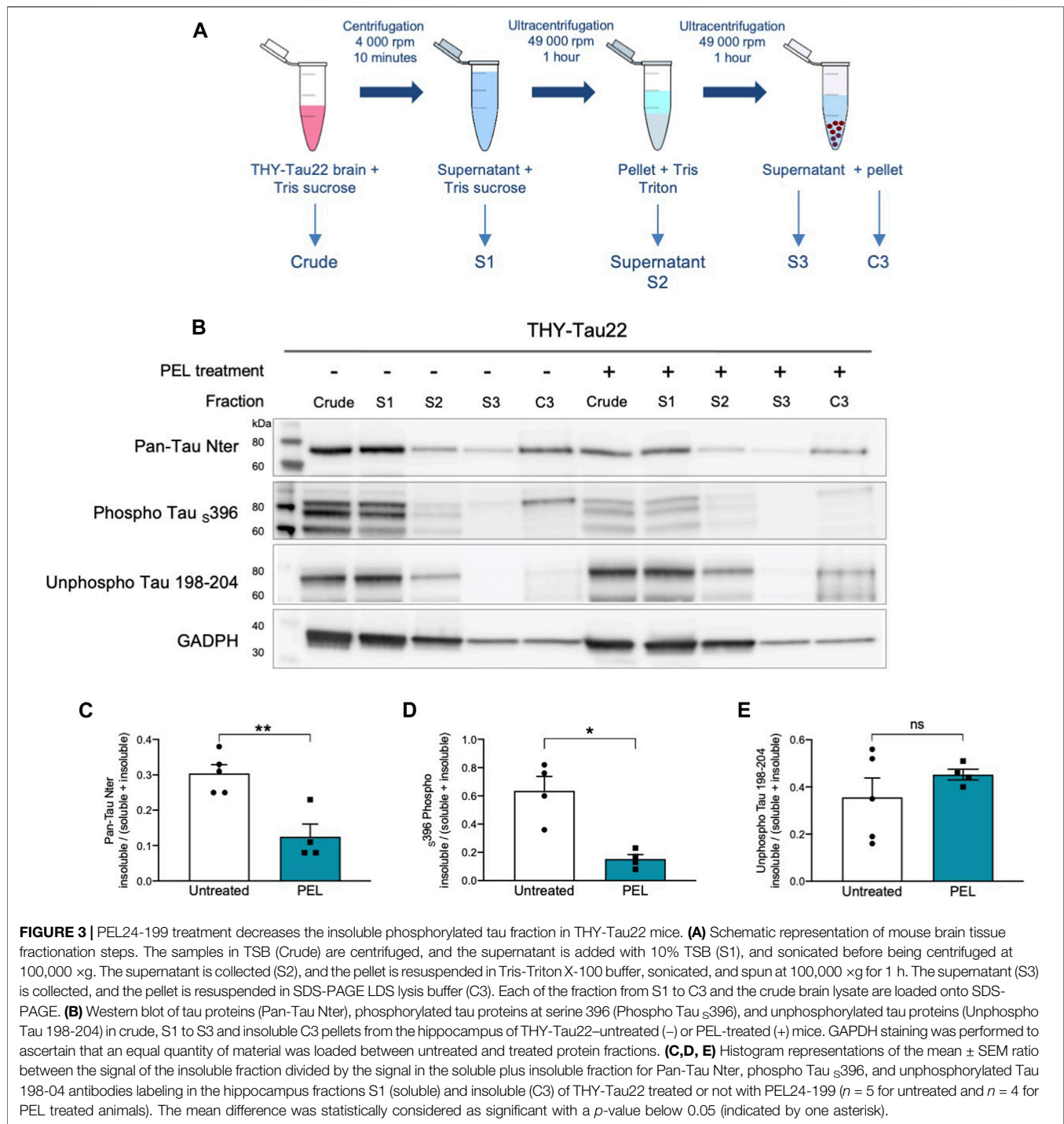
DISCUSSION

In the present study, we show that the β -secretase noncompetitive inhibitor compound PEL24-199 represses the tau pathology, increases PP2A_C expression, reduces the GFAP-positive astrogliosis, and improves short-term spatial memory in the well-characterized THY-Tau22 transgenic model of hippocampal neurodegeneration. These results, therefore, suggest that this APP metabolism regulatory compound PEL24-199 mitigates the tau pathology *in vivo*. This effect is observed in a curative paradigm, and results are in line with previous studies, where molecules derived from the same pharmacophore were effective in a preventive paradigm against both amyloid and tau pathologies (Sergeant et al., 2019).

A compound containing the same pharmacophore which is additionally fused to a tacrine moiety, RPEL, was shown to reduce both the amyloid pathology in the APPxPS1 transgenic animals and tau pathology in the THY-Tau22 hippocampal neurofibrillary degeneration model (Sergeant et al., 2019). These effects were also associated with a cognitive improvement, however, in a preventive paradigm since animals were treated starting from the age of 3 months before the appearance of lesions in both transgenic models.

A structure–activity relationship strategy was used to compare two compounds that differ by a single nitrogen atom that share a β -secretase noncompetitive inhibitory effect; however, the lysosomotropic activity was only associated with MAGS02-14 *in vitro* (Gay et al., 2018). This lysosomotropic activity is common to several compounds that were originally derived from chloroquine (Melnyk et al., 2015). Through the alkalization of intravesicular pH, the lysosomotropic activity of compounds inhibits the β -secretase pH-dependent activity and represses the autophagic flux (Schrader-Fischer and Paganetti 1996; Tam et al., 2014). Dosage of MAGS02-14 in the brain tissue showed an accumulation when compared to PEL24-199 (**Supplementary Figure S1**). This accumulation could be a contributing factor to its inefficacy and could potentially be deleterious. Modulation of the γ -secretase that is routed to the early endosome together with the β -secretase is likely not contributing to the observed effect of our compounds since Notch1 γ -secretase processing is not modified by RPEL, MAGS02-14, or PEL24-199 (Gay et al., 2018; Sergeant et al., 2019). Moreover, chloroquine and molecules having a lysosomotropic activity inhibit the autophagy flux, the effect of which was also shown previously *in vitro* for MAGS02-14 (Gay et al., 2018). Several markers of autophagia including mTOR and its downstream target p70S6K (Lipton and Sahin, 2014) as well as p62 and LC3 were analyzed, and no modulation was observed *in vivo* following 7 weeks of treatments of THY-Tau22. Together, our results suggest that the lysosomotropic activity is not necessary for the *in vivo* activity of our compounds, whereas the β -secretase noncompetitive inhibitory activity is more likely essential.

Although a direct relationship between β -secretase aspartyl proteases BACE1 or BACE2 and tau protein expression has not yet been established, a growing body of evidence suggests an interplay between tau protein and the β -secretase processing of APP. β -secretase inhibitors or γ -secretase modulators were shown to reduce tau protein expression in control neurons derived from human stem cell-derived excitatory cortical neurons (Moore et al., 2015). Following PEL24-199 treatment of THY-Tau22 mice, tau phosphorylation was reduced at hyperphosphorylated sites and pathological phospho-sites. Moreover, the insoluble fraction of tau as well as the number of neurofibrillary tangles was reduced. Notably, the decrease of tau phosphorylation was not followed by an increase in tau plasmatic clearance (**Supplementary Figure S8**), suggesting that the positive effects observed with PEL24-199 treatment on the decrease of tau pathology are not related to a change in



the plasma clearance of tau protein. Modulation of tau phosphorylation can be attributed to the modification of PP2A expression, as there is an inverse relation between the hyperphosphorylation of tau Ser202/Thr205 and PP2A activity (Kins et al., 2003). Moreover, increased activation of PP2A was shown to contribute to the restoration of cognitive functions in THY-Tau22 mice, also in a curative paradigm (Ahmed et al., 2020). PP2A is inhibited in AD and suggested to contribute to the hyperphosphorylation of tau and the regulation of APP

metabolism (Taleski et al., 2021). PP2A catalytic subunit expression is increased in THY-Tau22 mice treated with PEL24-199 but not in mice treated with MAGS02-14, first showing the specific effect of PEL24-199, and second, we can assume a relationship between the reduction of tau phosphorylation and increased expression of PP2A. Moreover, the increased expression was not associated with a change of methylation status of PP2A_C, therefore suggesting that a gain of PP2A activity is more likely a consequence of an

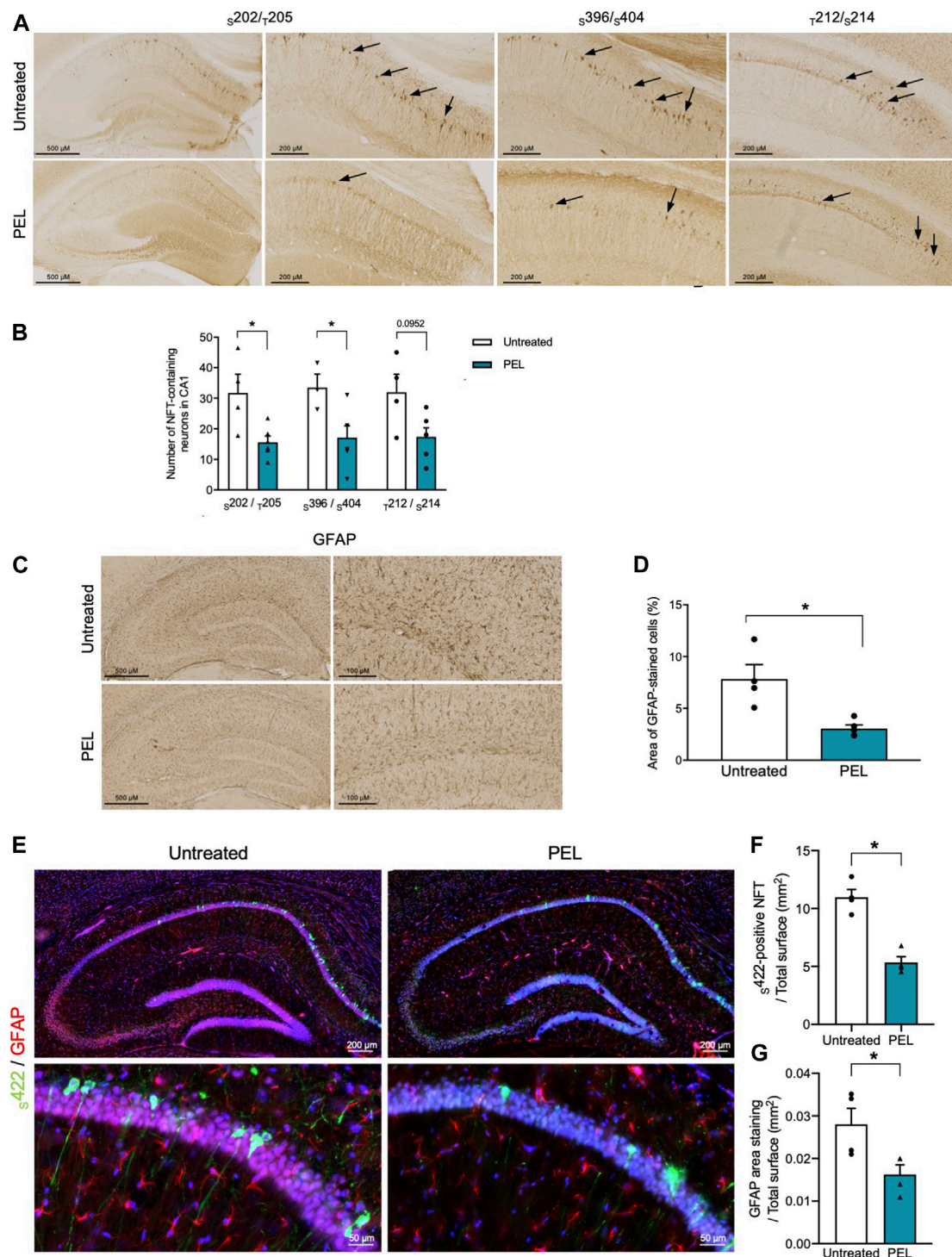


FIGURE 4 | Tau pathology and astrogliosis are reduced in PEL24-199 THY-Tau22-treated animals. **(A)** Immunohistochemistry with the phospho-Tau antibodies against phospho-epitopes $\text{s202}/\text{s205}$ and $\text{s396}/\text{s404}$ or pathological epitopes ($\text{s212}/\text{s214}$) in the hippocampus of THY-Tau22 animals treated or not with PEL24-199 (PEL). **(B)** The mean $\pm$ SEM number of NFT-labeled neurons observed in three brain slices per animal ($n = 4$ animals per condition) are represented on the histogram. Labeled neurons with the $\text{s202}/\text{s205}$, $\text{s396}/\text{s404}$, and $\text{s212}/\text{s214}$ were counted in the hippocampus of untreated (uncolored bars) and PEL24-199-treated (blue bars) animals. Statistical differences between untreated and treated conditions were significant with a p -value below 0.05 (*). **(C)** Reactive astrocytes were labeled with glial fibrillary acidic antibody (GFAP) in sections of the hippocampus of untreated and PEL24-199 (PEL)-treated THY-Tau22 mice. **(D)** Histogram representation of the mean $\pm$ SEM ratio of GFAP labeling upon the total hippocampal surface in mm^2 (three individual hippocampal sections per animal and a minimum of four animals per condition). Statistical differences between untreated and treated conditions were significant with a p -value below 0.05 (*). **(E)** Immunofluorescence analysis of s422- (Continued)

FIGURE 4 | positive NFTs and astrogliosis in the hippocampus of THY-Tau22 mice treated or not with PEL24-199 (PEL). The κ 422 antibody was used for the detection of NFTs (in green) and the GFAP antibody was used to stain reactive astrocytes (in red). Note that the κ 422 and GFAP staining were significantly reduced in THY-Tau22 mice treated with PEL24-199 (PEL). **(F)** Ratio of the number of κ 422-positive NFTs over the total surface in mm² of the CA1 of the hippocampus of untreated or PEL24-199 (PEL) THY-Tau22-treated animals. Statistical differences between untreated and treated conditions were significant with a *p*-value below 0.05 (*). **(G)** Ratio of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining over the total surface in mm² of the hippocampal CA1 of PEL24-199 (PEL) treated or untreated THY-Tau22 mice. Statistical differences between untreated and treated conditions were significant with a *p*-value below 0.05 (*). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM from three brain slices of four animals per condition.

increased expression of PP2A. In PEL24-199-treated mice, the insoluble tau fraction was reduced, indicating that the proportion of aggregated tau is diminished, resulting in the lowering of existing neurofibrillary degenerating processes, the inhibition of this process, or both. These results are strengthened by the significant lowering of the number of neurofibrillary degenerating neurons in the brain of PEL24-199-treated animals. We, therefore, demonstrated that PEL24-199 can decrease the tau pathology *in vivo* by reducing the number of NFTs present in the hippocampus. Together, these results demonstrate a reduction of the neurofibrillary degenerating process in THY-Tau22-treated mice when compared to untreated animals, and therefore PEL24-199 compound reduces the tau pathology in a curative paradigm together with the recovery of the short-term spatial memory. Our results are in line with the article of Moore et al. (Moore et al., 2015), in which they showed that manipulating APP metabolism by β -secretase inhibition results in a specific decrease in tau protein levels, demonstrating that APP metabolism regulates tau proteostasis. Such modulatory effect of both APP and tau was achieved with an activator of the chaperone-mediated autophagia (CMA), further suggesting another therapeutic route active on both APP and tau pathology (Bourdenx et al., 2021). Our data suggest that modulating the metabolism of APP with small molecules can affect not only tau protein levels but also the neurofibrillary degenerating process, and in turn improve cognitive functions.

Few studies involving β -secretase inhibitors were shown to reverse or attenuate the behavioral and memory deficits in transgenic mouse models of AD (Imbimbo and Watling, 2019). Research into the therapeutics for neurodegenerative diseases have proposed several different small molecules as candidates either targeting A β or tau lesions (Morimoto et al., 2013; Lecoutey et al., 2014; Yahiaoui et al., 2016), including autophagy modulators (Silva et al., 2020; Bourdenx et al., 2021), but to our knowledge, none of them, except the CMA activator (Bourdenx et al., 2021), acts on both the amyloid and tau pathological processes. BACE1 and BACE2 degrade A β peptides besides just being the proteases necessary to produce A β peptides (Abdul-Hay et al., 2012). Thus, current inhibitors may also affect A β degradation through incomplete repression of the aspartyl protease activity of BACE proteases (Liebsch et al., 2019). As PEL24-199 is not a direct enzymatic inhibitor of BACE1, this compound may differently modulate the APP metabolism and therefore potentially preclude the detrimental effect of pure β -secretase inhibitors.

Astrogliosis is an inflammatory response that potentiates the progression of neurodegenerative diseases and can be considered as a potential therapeutic target (Phillips et al., 2014; Chung et al., 2015). Astrocytes have a discrete regulatory function of synapses

and neuronal plasticity, and, for instance, specific reduction of connexin43 in astrocytes reduces the memory impairment in APPxPS1 mice (Ren et al., 2018). Levels of GFAP-reactive astrocytes are closely associated with dementia in AD (Perez-Nievas et al., 2013). More recently, senescent astrocyte accumulation was shown to promote the formation of hyperphosphorylated tau aggregates, and the reduction of the senescent astrocytes prevents PS19 tau transgenic mice from cognitive decline, as well as a decline in tau pathology has been reported (Bussian et al., 2018), which shows a close interplay between the tau pathology and reactive astrogliosis. Herein, we showed that GFAP-positive reactive astrocytes were reduced in THY-Tau22 mice treated with PEL24-199 when compared to untreated mice. This GFAP-reactive astrocyte reduction could either result from the direct effect of PEL24-199 on astrocytes or indirectly related to the reduction of the tau pathology. The suppression of tau expression in the double APP/PS1 $\times$ rTg4510 transgenic as well as in the rTg4510 transgenic model of tau pathology reduced the burden of NFTs and the astrogliosis, and a relatively larger proportion in the single rTg4510 (DeVos et al., 2018). These results taken together could suggest that the reduced astrogliosis in the THY-Tau22 treated with PEL24-199 could be attributed in part to a direct effect of PEL24-199. This reduced astrogliosis may also contribute to the cognitive improvement observed in PEL24-199-treated animals.

In the present study, we showed that PEL24-199, but not MAGS02-14, leads to a restoration of cognitive functions and also to a reduction of the tau pathology and associated astrogliosis in the tau pathology transgenic model THY-Tau22. The effect of our molecule relies on a modification of APP processing through a noncompetitive β -secretase modulation effect and where the lysosomotropic activity is dispensable. Thus, PEL24-199 treatment in the curative paradigm reduces the tau pathology and astrogliosis, and restores short-term memory. Together, these results indicate that we have a molecule efficient on APP metabolism (Gay et al., 2018; Tautou et al., unpublished data) but also on tau pathology *in vivo*. Further investigations will be necessary to elucidate the precise molecular mechanism of action of these molecules which are effective on both amyloid and tau pathology.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the French Direction of Veterinary Services with the approved registration number APAFIS#10392-201706231206250v4.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MT obtained the data, performed the analysis and interpretation, and contributed to the writing of the manuscript. SE performed the animal and behavioral tests. FD, PL, and JB designed, synthesized the molecules, and performed the brain dosage. MD was responsible for generating the animals. CL contributed to biochemical analyses. LMG wrote and corrected the manuscript. DB and LB contributed to the design of the study. PM and NS have made the design of the study, data analysis, interpretation, and wrote the manuscript with the contribution of all authors who approved the submitted and the revised manuscript version.

FUNDING

This work was supported by the INSERM and the University of Lille. Grants were obtained from ANR (VIDALZ, ANR-15-CE18-0002) and the LabEx DISTALZ (Development of Innovative

Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's disease) and supported also by Association France Alzheimer Grant #3131. MT and FD hold a doctoral scholarship from Lille University.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the BICeL (Imagerie Cellulaire et Tissulaire) platform, the IVF (Imagerie du Vivant et Fonctions-Plateau d'explorations fonctionnelles) platform, the genotyping platform, and the Lille ADME platform (U1177), particularly Sébastien Carrier and Catherine Piveteau. The 300 MHz NMR facilities were funded by the Région Nord Pas-de-Calais (France), the Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche (MJENR), and the Fonds Européens de Développement Régional (FEDER). We would like to thank Dihia Amara and Katia Arab for their technical assistance, and the SPQI Company for providing phospho-Tau antibodies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.679335/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abdul-Hay, S. O., Sahara, T., McBride, M., Kang, D., and Leissring, M. A. (2012). Identification of BACE2 as an Avid SS-Amyloid-Degrading Protease. *Mol. Neurodegeneration* 7, 46. doi:10.1186/1750-1326-7-46
- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Cailliez, R., Buée, L., Blum, D., D'Hooge, R., et al. (2020). Chronic Sodium Selenate Treatment Restores Deficits in Cognition and Synaptic Plasticity in a Murine Model of Tauopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 570223. doi:10.3389/fnmol.2020.570223
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., and Hyman, B. T. (2002). Specific Tau Phosphorylation Sites Correlate with Severity of Neuronal Cytopathology in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol.* 103, 26–35. doi:10.1007/s004010100423
- Bourdenx, M., Martin-Segura, A., Scrivo, A., Rodriguez-Navarro, J. A., Kaushik, S., Tasset, I., et al. (2021). Chaperone-mediated Autophagy Prevents Collapse of the Neuronal Metastable Proteome. *Cell* 184, 2696–2714. doi:10.1016/j.cell.2021.03.048
- Buée, L., Bussière, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative disorders. These Authors Contributed Equally to This Work. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130. doi:10.1016/s0165-0173(00)00019-9
- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., and Baker, D. J. (2018). Clearance of Senescent Glial Cells Prevents Tau-dependent Pathology and Cognitive Decline. *Nature* 562, 578–582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y
- Carvalho, K., Faivre, E., Pietrowski, M. J., Marques, X., Gomez-Murcia, V., Deleau, A., et al. (2019). Exacerbation of C1q Dysregulation, Synaptic Loss and Memory Deficits in Tau Pathology Linked to Neuronal Adenosine A2A Receptor. *Brain* 142, 3636–3654. doi:10.1093/brain/awz288
- Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., and Stevens, B. (2015). Do glia Drive Synaptic and Cognitive Impairment in Disease? *Nat. Neurosci.* 18, 1539–1545. doi:10.1038/nn.4142
- DeVos, S. L., Corjuc, B. T., Commins, C., Dujardin, S., Bannon, R. N., Corjuc, D., et al. (2018). Tau Reduction in the Presence of Amyloid- β Prevents Tau Pathology and Neuronal Death *In Vivo*. *Brain* 141, 2194–2212. doi:10.1093/brain/awy117
- Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2015). Autophagy and Neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 125, 65–74. doi:10.1172/JCI73944
- Gao, Y., Tan, L., Yu, J.-T., and Tan, L. (2018). Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Car* 15, 283–300. doi:10.2174/1567205014666170417111859
- Gay, M., Evrard, C., Descamps, F., Carato, P., Renault, N., Coevoet, M., et al. (2018). A Phenotypic Approach to the Discovery of Compounds that Promote Non-amyloidogenic Processing of the Amyloid Precursor Protein: Toward a New Profile of Indirect β -secretase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 159, 104–125. doi:10.1016/j.ejmech.2018.08.092
- Imbimbo, B. P., and Watling, M. (2019). Investigational BACE Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 28, 967–975. doi:10.1080/13543784.2019.1683160
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., et al. (2019). NLRP3 Inflammasome Activation Drives Tau Pathology. *Nature* 575, 669–673. doi:10.1038/s41586-019-1769-z
- Kins, S., Kuroinski, P., Nitsch, R. M., and Götz, J. (2003). Activation of the ERK and JNK Signaling Pathways Caused by Neuron-specific Inhibition of PP2A in Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* 163, 833–843. doi:10.1016/S0002-9440(10)63444-X
- Laurent, C., Bu e, L., and Blum, D. (2018). Tau and Neuroinflammation: What Impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomed. J.* 41, 21–33. doi:10.1016/j.bj.2018.01.003
- Laurent, C., Doroth e, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., et al. (2017). Hippocampal T Cell Infiltration Promotes Neuroinflammation and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Brain* 140 (1), 184–200. doi:10.1093/brain/aww270
- Le Freche, H., Brouillette, J., Fernandez-Gomez, F.-J., Patin, P., Cailliez, R., Zommer, N., et al. (2012). Tau Phosphorylation and Sevoflurane Anesthesia. *Anesthesiology* 116, 779–787. doi:10.1097/ALN.0b013e31824be8c7

- Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., et al. (2014). Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/ acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3825–E3830. doi:10.1073/pnas.1410315111
- Liebsch, F., Kulic, L., Teunissen, C., Shobo, A., Ulku, I., Engelschalt, V., et al. (2019). A β 34 Is a BACE1-Derived Degradation Intermediate Associated with Amyloid Clearance and Alzheimer's Disease Progression. *Nat. Commun.* 10, 2240. doi:10.1038/s41467-019-10152-w
- Lipton, J. O., and Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. *Neuron* 84, 275–291. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of Protein Phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the Regulation of Tau Phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., et al. (2012). Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology *In Vivo*. *PLoS ONE* 7, e31302. doi:10.1371/journal.pone.0031302
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., et al. (2018). Chloroquine Inhibits Autophagic Flux by Decreasing Autophagosome-Lysosome Fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455. doi:10.1080/15548627.2018.1474314
- Melnyk, P., Vingtdoux, V., Burlet, S., Eddarkaoui, S., Grosjean, M.-E., Larchanché, P.-E., et al. (2015). Chloroquine and Chloroquinoline Derivatives as Models for the Design of Modulators of Amyloid Peptide Precursor Metabolism. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 559–569. doi:10.1021/cn5003013
- Moore, S., Evans, L. D. B., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T. B., et al. (2015). APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons. *Cel Rep.* 11, 689–696. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.068
- Morimoto, B. H., Schmechel, D., Hirman, J., Blackwell, A., Keith, J., and Gold, M. (2013). A Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending-Dose, Randomized Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Effects on Cognition of AL-108 after 12 Weeks of Intranasal Administration in Subjects with Mild Cognitive Impairment. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 35, 325–339. doi:10.1159/000348347
- Müller, U. C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just Amyloid: Physiological Functions of the Amyloid Precursor Protein Family. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 281–298. doi:10.1038/nrn.2017.29
- Nixon, R. A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy Failure in Alzheimer's Disease-Locating the Primary Defect. *Neurobiol. Dis.* 43, 38–45. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.021
- Papon, M.-A., El Khoury, N. B., Marcouiller, F., Julien, C., Morin, F., Bretteville, A., et al. (2013). Deregulation of Protein Phosphatase 2A and Hyperphosphorylation of Protein Following Onset of Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* 62, 609–617. doi:10.2337/db12-0187
- Perez-Nievas, B. G., Stein, T. D., Tai, H.-C., Dols-Icardo, O., Scotton, T. C., Barroeta-Espar, I., et al. (2013). Dissecting Phenotypic Traits Linked to Human Resilience to Alzheimer's Pathology. *Brain* 136, 2510–2526. doi:10.1093/brain/awt171
- Phillips, E. C., Croft, C. L., Kurbatskaya, K., O'Neill, M. J., Hutton, M. L., Hanger, D. P., et al. (2014). Astrocytes and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1321–1325. doi:10.1042/BST20140155
- Piras, A., Collin, L., Grüninger, F., Graff, C., and Rönnebeck, A. (2016). Autophagic and Lysosomal Defects in Human Tauopathies: Analysis of post-mortem Brain from Patients with Familial Alzheimer Disease, Corticobasal Degeneration and Progressive Supranuclear Palsy. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 22. doi:10.1186/s40478-016-0292-9
- Ren, R., Zhang, L., and Wang, M. (2018). Specific Deletion Connexin43 in Astrocyte Ameliorates Cognitive Dysfunction in APP/PS1 Mice. *Life Sci.* 208, 175–191. doi:10.1016/j.lfs.2018.07.033
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégar, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., et al. (2006). Alzheimer's Disease-like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits. *Am. J. Pathol.* 169, 599–616. doi:10.2353/ajpath.2006.060002
- Schrader-Fischer, G., and Paganetti, P. A. (1996). Effect of Alkalizing Agents on the Processing of the P-Amyloid Precursor Protein. *Brain Res.* 716 (1–2), 91–100. doi:10.1016/0006-8993(96)00002-9
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's Disease and Related Neurological Disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224. doi:10.1586/14789450.5.2.207
- Sergeant, N., Fernandez-Gomez, F.-J., Obriot, H., Eddarkaoui, S., Buée-Scherrer, V., and Buée, L. (2017). “Two-Dimensional Electrophoresis Protocols to Analyze the Microtubule-Associated Tau Proteins from Several Biological Sources,” in *Tau Protein Methods in Molecular Biology*. Editor C. Smet-Nocca (New York, NY: Springer New York), 251–261. doi:10.1007/978-1-4939-6598-4_14
- Sergeant, N., Vingtdoux, V., Eddarkaoui, S., Gay, M., Evrard, C., Le Fur, N., et al. (2019). New Piperazine Multi-Effect Drugs Prevent Neurofibrillary Degeneration and Amyloid Deposition, and Preserve Memory in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Dis.* 129, 217–233. doi:10.1016/j.nbd.2019.03.028
- Sergeant, N., Wattez, A., Galvn-valencia, M., Ghestem, A., David, J.-P., Lemoine, J., et al. (2003). Association of Atp Synthase α -chain with Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 117, 293–303. doi:10.1016/S0306-4522(02)00747-9
- Silva, M. C., Nandi, G. A., Tentarelli, S., Gurrell, I. K., Jamier, T., Lucente, D., et al. (2020). Prolonged Tau Clearance and Stress Vulnerability rescue by Pharmacological Activation of Autophagy in Tauopathy Neurons. *Nat. Commun.* 11, 3258. doi:10.1038/s41467-020-16984-1
- Sontag, J.-M., and Sontag, E. (2014). Protein Phosphatase 2A Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnmol.2014.00016
- Taleski, G., Schuhmacher, D., Su, H., Sontag, J.-M., and Sontag, E. (2021). Disturbances in PP2A Methylation and One-Carbon Metabolism Compromise Fyn Distribution, Neuritogenesis, and APP Regulation. *J. Biol. Chem.* 296, 100237. doi:10.1074/jbc.RA120.016069
- Tam, J. H., Seah, C., and Pasternak, S. H. (2014). The Amyloid Precursor Protein Is Rapidly Transported from the Golgi Apparatus to the Lysosome and where it Is Processed into Beta-Amyloid. *Mol. Brain* 7, 54. doi:10.1186/s13041-014-0054-1
- Van der Jeugd, A., Vermaercke, B., Derisbourg, M., Lo, A. C., Hamdane, M., Blum, D., et al. (2013). Progressive Age-Related Cognitive Decline in Tau Mice. *J. Alzheimers Dis.* 37 (4), 777–788. doi:10.3233/JAD-130110
- Yahiaoui, S., Hamidouche, K., Ballandonne, C., Davis, A., de Oliveira Santos, J. S., Freret, T., et al. (2016). Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT4R) Partial Agonist and 5-HT6R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* 121, 283–293. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.048

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

Copyright © 2021 Tautou, Eddarkaoui, Descamps, Larchanché, El Bakali, Goveas, Dumoulin, Lamarre, Blum, Buée, Melnyk and Sergeant. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.