Impact d'un régime riche en gras sur la pathologie tau de type maladie d'Alzheimer

Mémoire

Ophélie Lerdu

Maîtrise en neurobiologie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Ophélie Lerdu, 2019

Résumé

La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus répandue dans le monde. Il existe de nombreux facteurs de risque dont le principal est l'âge mais également le diabète et l'obésité. Les principales affections neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer sont l'atrophie cérébrale, les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires formées de la protéine tau hyper- et anormalement phosphorylée. Cette altération dans la phosphorylation de tau peut s'expliquer par un déséquilibre entre les kinases et les phosphatases. Une altération du métabolisme du glucose et une résistance à l'insuline sont aussi observées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, une atrophie cérébrale et des dégénérescences neurofibrillaires ont été observées chez des patients souffrant d'obésité et de diabète. Il semble donc qu'il y ait un lien étroit entre la pathologie tau, l'obésité et le diabète. Différentes études ont cherché à déterminer l'impact d'un régime riche en gras sur la pathologie tau mais les résultats sont controversés.

Etant donné que l'obésité est un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer, mon hypothèse est qu'un régime riche en gras peut induire une hyperphosphorylation de tau. Cependant nous aimerions voir si l'obésité peut être un facteur de risque sans être accompagnée d'une résistance à l'insuline. En effet, jusqu'à présent, les études montrent principalement le rôle de la résistance à l'insuline comme facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer.

Mon objectif est donc d'étudier l'impact d'un régime riche en gras sur la protéine tau, dans un modèle de souris sauvages et de souris hTau (un modèle qui exprime la protéine tau humaine sans mutations) et de déterminer les mécanismes impliqués.

Après un régime riche en gras, nous n'avons pas observé de modifications significatives de la phosphorylation de tau chez les souris hTau, seulement une augmentation significative chez les mâles sauvages et une diminution significative chez les femelles sauvages. Ces résultats nous poussent à penser que les souris hTau pourraient être résistantes à l'impact d'un régime riche en gras, contrairement aux souris sauvages.

Abstract

Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the world. There are many risk factors, the most important of which are age, but also diabetes and obesity. The main neuropathological disorders of Alzheimer's disease are cerebral atrophy, amyloid plaques and neurofibrillary tangles formed by hyper- and abnormally phosphorylated tau protein. This alteration in the phosphorylation of tau can be explained by an imbalance between the kinases, and the phosphatases. Impaired glucose metabolism and insulin resistance is also observed in brain of patients with Alzheimer's disease. On the other hand, brain atrophy and neurofibrillary tangles have been observed in patients suffering from obesity and diabetes. It therefore seems that there is a close link between tau pathology, obesity and diabetes. Different studies have sought to determine the impact of a high-fat diet on tau pathology but the results are controversial.

Since obesity is a risk factor for Alzheimer's disease, my hypothesis is that a high-fat diet can induce hyperphosphorylation of tau without being accompanied by insulin resistance. However, we would like to see if obesity can be a risk factor without insulin resistance. Indeed, so far, studies have mainly shown the role of insulin resistance as a risk factor for Alzheimer's disease.

My goal is to study the impact of a high-fat diet on tau protein, in a model of wild-type mice and hTau mice (a model that expresses human tau protein without mutations) and to determine the mechanisms involved.

Following a high-fat diet, we did not observe any significant changes in tau phosphorylation in hTau mice, only a significant increase in wild-type males and a significant decrease in wild-type females. These results lead us to believe that hTau mice appear to be resistant to the impact of a high-fat diet, unlike wild-type mice.

Table des matières

Résumé ..... **ii**

Abstract ..... **iii**

Table des matières ..... **iv**

Liste des figures ..... **vii**

Liste des tableaux ..... **viii**

Liste des abréviations ..... **ix**

Remerciements ..... **xiv**

Avant-propos ..... **xvi**

Introduction **1**

1. La maladie d'Alzheimer **2**

1.1. Historique 2

1.2. Prévalence, origine et facteurs de risque 3

1.2.1. Prévalence 3

1.2.2. Origine infectieuse ou génétique 4

1.2.3. Facteurs de risque 5

1.3. Symptômes et diagnostic 6

1.3.1. Symptômes 6

1.3.2. Diagnostic 7

1.4. Traitements et préventions 8

1.4.1. Traitements 8

1.4.2. Préventions 9

1.5. Affections neuropathologiques 10

1.5.1. Atrophie cérébrale 10

1.5.2. Altération du métabolisme du glucose 11

1.5.3. Plaques amyloïdes 12

1.5.4. Enchevêtrements neurofibrillaires 14

2. La protéine tau **16**

2.1. Structure 16

2.1.1. Gène tau et isoformes 16
2.1.2. Structure et conformation 17
2.2. Modifications post-traductionnelles de tau 17
2.2.1. Phosphorylation 17
2.2.2. Déphosphorylation 18
2.2.3. Autres modifications 19
2.3. Localisation et fonction de tau 19
2.3.1. Localisation 19
2.3.2. Régulation de la dynamique des microtubules 19
2.3.3. Autres rôles de tau 20
2.4. Tau dans la MA 22
2.4.1. Origine des tauopathies 22
2.4.2. Modifications post-traductionnelles pathologiques de tau 23
2.4.3. Les agrégats 23
3. Insuline et obésité 26
3.1. Insuline 26
3.1.1. Insuline périphérique 26
3.1.2. Insuline centrale 27
3.1.3. Le diabète 29
3.2. Obésité 30
3.2.1. Obésité, insuline et MA 30
3.2.2. Modèles d'obésités 31
Chapitre 1 : Étude d'un régime riche en gras sur des souris sauvages et hTau, un modèle de la maladie d'Alzheimer 35
Impact of a high-fat diet on insulin resistance and tau phosphorylation in WT and hTau mice. 36
1. Résumé 37
2. Abstract 38
3. Introduction 39
4. Methods 41
4.1. Animals. 41
4.2. Protein extraction 42
4.3. Purification of aggregates. 42

4.4. Western blotting. 42
4.5. Statistical analysis..... 43
5. Results 44
5.1. Impact of a high-fat diet on metabolism..... 44
5.2. Impact of a high-fat diet on tau phosphorylation and aggregation. 46
5.3. Impact of a high-fat diet on the main tau kinase and phosphatase. 47
6. Discussion 51
7. Supplementary data 54
Chapitre 2 : Discussion et perspective 56
1. Retour sur les résultats et limites 57
2. Perspectives 60
Conclusion 62
Bibliographie 63
Annexe 75
Annexe A : Composition des diètes 75
Annexe B : Liste des anticorps utilisés. 76

Liste des figures

Figure 1 : Portrait d'Auguste Deter (A). Portrait de Alois Alzheimer photographié à Berlin (B). Dessin des dégénéréscences neurofibrillaires par Alois Alzheimer (C). 3
Figure 2 : Image de l'atrophie cérébrale et de la dilatation des ventricules. 10
Figure 3 : Schéma des deux voies de clivage de la protéine du précurseur de l'amyloïde. 12
Figure 4 : Image des plaques neuritiques (A) et schéma de l'évolution spatio-temporelle de la pathologie amyloïde (B). 13
Figure 5 : Image de l'évolution des enchevêtrements neurofibrillaires. 14
Figure 6 : Schéma de l'évolution spatio-temporelle de la pathologie tau. 15
Figure 7 : Schéma des 6 isoformes de la protéine tau. 16
Figure 8 : Schéma des domaines fonctionnels de l'isoforme 2N4R de tau. 17
Figure 9 : Schéma des 85 sites de phosphorylation de la protéine tau sur l'isoforme 2N4R. 18
Figure 10 : Schéma du modèle de la régulation de PTEN par tau au sein de la voie de signalisation à l'insuline cérébrale. 22
Figure 11 : Schéma des modifications de tau menant à son agrégation. 24
Figure 12 : Image et schéma du profil électrophorétique des Tauopathies. 25
Figure 13 : Schéma de l'insuline. 26
Figure 14 : Schéma du clivage de la pré-pro-insuline donnant l'insuline 26
Figure 15 : Schéma de la voie de signalisation de l'insuline dans le cerveau. 28
Figure 16 : Effet de l'insuline en condition normale et lors d'un diabète de type 2. 29
Figure 17 : Effect of HFD on metabolic features in female and male mice. 45
Figure 18 : Phosphorylation of tau protein epitopes in the cortex of WT and hTau mice. 48
Figure 19 : Aggregation of human tau protein in the cortex of hTau mice. 48
Figure 20 : Phosphorylation of different kinases and the insulin receptor in the cortex of WT and hTau mice. 49
Figure 21 : Methylation and Demethylation of the main phosphatase of tau in the cortex and the hippocampus of WT and hTau mice. 50
Figure 22 : Effets de la protéine tau murine sur la tolérance au glucose. 59
Figure 23 : Relation entre tau et la signalisation de l'insuline. 61

Figure S1 : Phosphorylation of tau protein epitopes in the hippocampus of WT and hTau mice. 54
Figure S2 : Phosphorylation of different kinases and the insulin receptor in the cortex of WT and hTau mice. 55

Liste des tableaux

Table 1 : Comparaison d'études sur l'impact d'un régime riche en gras sur la pathologie tau dans différents modèles de souris. 33

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
Aβ	Peptide amyloïde β
ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	*APP intracellular domain*
AMPK	*5' adenosine monophosphataste-activated protein kinase*
APH-1	*Anterior pharynx defective*
APO	Apolipoprotéine
APP	*Amyloïde precursor protein*
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CaMKII	*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*
Cdk5	*Cyclin-dependant kinase 5*
C-terminale	Carboxy-terminale
DCB	Dégénérescence corticobasale
DFTP-17	Démences fronto-temporales de type parkinsonien liées au chromosome 17
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
eNFT	NFT extra-neuronal
ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
GLUT	*Glucose transporter*
Grb2	*Growth factor receptor binding protein*
GSK3-β	*Glycogen synthase kinase 3-β*
GTT	*Glucose tolerance test*
HFD	*High-fat diet*
IGF	*Insulin-like growth factor-1*
IMC	Index de masse corporelle
iNFT	NFT intra-neuronal
INS	Gène de l'insuline
IR	*Insulin receptor*
IRS	*Insulin receptor substrat*
ITT	*Insulin tolerance test*
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*

LCR	Liquide céphalo-rachidien
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP1A	*Microtubule associated protein 1A*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MAPT	*Microtubule associated protein*
MMSE	*Mini mental state examination*
MoCA	*Montreal cognitive assessment*
MT	Microtubule
MTBD	*Microtubule binding domain*
NFT	*Neurofibrillary tangle*
NT	Neurotransmetteurs
N-Terminale	Amino-terminale
NINCDS-ADRDA	*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*
PDK1	*Phosphoinositide-dependent protein kinase-1*
PEN2	*Presenilin enhancer*
PESS	Panencéphalite subaiguë sclérosante
PHF	*Paired helical filaments*
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PP	Protéine phosphatase
PP2B	Calcineurine
PRD	*Proline-rich domain*
PS	Préséniline (gène)
PSEN	Préséniline (protéine)
PSP	Paralysie supranucléaire progressive
PTEN	*Phosphatase and TENsin homolog*
sAPP	*Soluble APP*
Ser	Sérine
SH3	*Src homology-3*
SNC	Système nerveux central
STZ	Streptozotocine
Syp	*Protein tyrosin phosphatase*

TEP-FDG	Tomographie à Émission de Positrons avec Fluorodéoxyglucose
TKO	*Tau knock-out*
T_{reg}	*Anti-inflammatory regulatory T-lymphocytes*
Tyr	Tyrosine
WT	*Wild-type*

À mes parents, Alain et Dolores, pour votre soutien et votre amour.
À la mémoire de Mamie rigolote.

« N'oublie jamais, celui qui croit savoir n'apprend plus. »

Pierre Bottero.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Emmanuel Planel, de m'avoir accueillie dans son laboratoire il y a deux ans. Merci pour cette incroyable aventure, pour vos conseils et votre patience. Merci également pour les opportunités de présentations et pour l'autonomie dont j'ai pu faire preuve.

Je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Un merci tout particulier à Françoise Morin, la professionnelle de recherche du laboratoire, qui m'a encadrée, guidée et rassurée tout au long de ma maîtrise. Grâce à toi j'ai appris à voler de mes propres ailes et à sacrer en Québécois. Je me suis surtout sentie très vite à l'aise dans l'équipe et c'est grâce à toi et à ta bonne humeur contagieuse que j'avais envie de venir au labo chaque matin. Je remercie également Claudia Goupil, toujours là pour répondre à mes questions et me prêter du matériel.

Je désire remercier Maud Gratuze sans qui je n'aurais pas pu travailler sur ce projet. Tu m'as beaucoup aidée à déceler mes erreurs, à savoir utiliser Prism, à comprendre mon sujet de recherche et tu étais toujours là pour répondre à mes questions, malgré la distance.

Je remercie Emmanuelle Boscher (Altesse sérénissime), la première personne à m'avoir intégrée au groupe du bloc P. Non seulement tu as su être une amie en or, mais en plus tu as été une super collègue, toujours là pour m'épauler dans les manips qui ne m'étaient pas familières. Nos sorties pokémons, patins, randos, trampoline, match de foot et les brunchs à Allô mon coco quand on allait au labo le week-end m'ont fait aimer le Québec et ta compagnie. Je remercie également Isabelle Guisle, avec qui j'ai eu le plaisir d'être en équipe et dont la patience et les conseils m'ont été d'une grande aide, ainsi que Andréanne Turgeon et Laura Eyoum Jong, qui ont aussi fait partie de l'équipe Planel. Je remercie Julia Hernandez-Rapp et Floriane Bretheau qui m'ont permis de m'impliquer dans la vie associative de l'axe Neurosciences ainsi que d'organiser et de participer à de nombreux évènements tels que les séminaires étudiants. Julia, merci pour ton aide pour les corrections de mes présentations orales et Floriane pour m'avoir fait découvrir le quiz du lundi soir à la Ninkasi. Je souhaite remercier Marine Tournissac, liée à toi par tau, merci pour ton aide et tes conseils sur le sujet. Enfin je tiens à remercier tous mes collègues et amis que j'ai eu la chance de côtoyer ces deux années : Léa Rodriguez, sur qui j'ai toujours pu compter, quel que soit les situations, j'ai apprécié tes nombreuses histoires autour de tes IPAs et de mes blondes; Baya Mdzomba, qui a eu l'impression de suivre une émission télé réalité quand on racontait nos vies, tu m'as beaucoup fait rire à chaque fois que tu étais perdu; Nicolas Josset et Mélody Mazon, deux rayons de soleils qui m'ont apporté joie, bonheur et amour; Mathilde Henry, qui m'a fait rire à en pleurer avec le jeux des dessins et avec qui,

joint par Hortense Fanet, nous refaisions le monde autour d'une clope; Sara Rainone, pour sa douceur, sa bienveillance et son accent à craquer; Marie-Kim St-Pierre, pour son sourire et ses cookies; Katherine Picard et Maude Bordeleau pour leur sympathie et leurs conseils en IHC; Chloé Lemaire, pour les parties de billards et les fous rires; Serena Petry, même si on ne se sera pas côtoyée longtemps ; et enfin Manon Leclerc, pour ton aide pour les cours et pour ta précieuse et première amitié lors de notre arrivée à Québec.

Je remercie également Justine, que j'ai eu la chance de retrouver au Québec après nos années d'études à Bordeaux, merci d'être toujours présente à mes côtés avec ton rire et ta folie; Thomas, fraichement arrivé mais maintenant indispensable à ma santé mentale et mon bonheur, merci pour ta thérapie, ta joie de vivre et ta maladresse; Emily, la meilleure coloc au monde, merci pour ton écoute, tes principes et ta vision du monde qui m'ont aidé à évoluer et à grandir; et tous les autres plus loin mais tout aussi présent : Aurélie, Camille, Sabine et Léa B. (merci d'être venu me voir), Sabrina, Lucille, Emilie…

Bien entendu, je tiens à remercier du plus profond de mon cœur, mes parents, sans qui cette aventure n'aurait jamais été possible. Leur soutien et leur fierté m'ont donné du courage et de la motivation. J'ai pu profiter de ce pays grâce à votre aide, j'ai été heureuse grâce à vos messages, vos appels et votre amour, palpable même à autant de kilomètres. Je remercie également ma famille en général, mes cousins et cousines pour vos petits messages de soutien et vos envies de me revoir après deux ans d'absence.

Pour finir, j'aimerais remercier Léa C., l'origine de cette venue dans le pays froid qu'est le Québec. Je n'aurais jamais osé franchir le pas sans toi et je n'aurais jamais été aussi heureuse. J'ai pu me concentrer sur mes études et l'avancée de mon projet grâce à ton soutien et ta force. Tu as toujours été là pour me rassurer, me consoler et me motiver à me lever à 6h30 le matin. Merci pour tout le chemin qu'on a parcouru ensemble.

Avant-propos

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire sont le résultat de deux années d'efforts dans le cadre de ma maîtrise. Durant cette période j'ai eu la chance de travailler sur deux autres projets qui ne sont pas en lien direct avec mon sujet et qui ne seront donc pas présentés dans ce mémoire : un projet visant à étudier le métabolisme des souris tau *knock-out* et un autre visant à étudier l'impact du sommeil et de la thermorégulation sur la pathologie de la maladie d'Alzheimer. Seul l'article de mon projet principal est intégré à ce mémoire.

L'introduction (chapitre 1) est une revue de littérature permettant d'aborder les différents concepts étudiés dans mon projet de maîtrise. Le chapitre 2 est présenté sous forme d'article en cours de soumission, et le chapitre 3 inclus la discussion avec les limites de l'étude et les perspectives.

L'article intégré au chapitre 2 a été élaboré par le Dr Emmanuel Planel et la Dre Maud Gratuze durant son doctorat dans le laboratoire. En tant qu'auteure principale, mon rôle dans cette étude a débuté après le sacrifice des souris afin d'extraire les protéines, d'effectuer les western blots, les analyses statistiques, l'interprétation des résultats, la réalisation des figures et la rédaction de l'article. Dre Maud Gratuze a élaboré le protocole, Françoise Morin s'est occupée du suivi des animaux, de contrôler le régime des souris et de faire les GTT et les ITT. Françoise Morin et la Dre Maud Gratuze ont procédé à la mesure du poids, de la température et de la glycémie puis au sacrifice, à la dissection des différentes structures cérébrales et autres tissus, ainsi qu'à la récupération du sang.

IMPACT OF A HIGH-FAT DIET ON INSULIN RESISTANCE AND TAU PHOSPHORYLATION IN WT AND HTAU MICE. **Lerdu O**, Gratuze M, Morin F, Planel E.
L'article sera soumis en 2020.

Introduction

1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie progressive et irréversible qui mène à une perte neuronale et à des troubles de la mémoire. Elle peut aussi conduire à des altérations de l'humeur, des émotions et du comportement, mais aussi à une perte des capacités fonctionnelle et physique. Cette maladie ne fait pas partie du processus normal de vieillissement et il en existe deux formes : la **forme précoce**, qui apparaît avant l'âge de 65 ans (2 à 10%) et qui se transmet principalement de manière héréditaire (la forme familiale) et la **forme tardive**, essentiellement sporadique, qui apparaît après l'âge de 65 ans (Harvey *et al.*, 2003; Gatz *et al.*, 2006; Van Cauwenberghe *et al.*, 2016).
Bien que cette maladie ait été découverte il y a plus de 100 ans, à l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour arrêter la maladie et un diagnostic précis ne peut être établi que lorsqu'un examen *post-mortem* du cerveau est effectué. Il est donc important de déterminer les facteurs de risque afin de prévenir et retarder l'apparition de la maladie d'Alzheimer.

1.1. Historique

Alois Alzheimer, né le 14 juin 1864, obtient son baccalauréat en 1883 puis entre à la Faculté de médecine de l'Université Royale Friedrich-Wilhelm. Il obtient son diplôme 5 ans plus tard et rejoint l'équipe médicale de l'hôpital psychiatrique de Francfort-sur-le-Main où il rencontre **Auguste Deter** en 1901, une patiente âgée de 51 ans qui présente des symptômes de démences séniles malgré son jeune âge (Verhey, 2009). En effet, Auguste Deter présente des troubles de la mémoire, des changements d'humeur et démontre parfois une certaine agressivité (Maurer *et al.*, 1997). Elle décède en 1906 suite à une pneumonie. Lorsqu'Alois Alzheimer examine son cerveau au microscope, il observe une **atrophie cérébrale**, une **perte de neurones**, une **pathologie fibrillaire** à l'intérieur des neurones et des **dépôts extracellulaires** qui ressemblent à des plaques séniles (Goedert and Ghetti, 2007). Ses travaux sont publiés en 1907 dans un article nommé «À propos d'une maladie particulière du cortex cérébral » traduit en anglais en 1995 (Alzheimer *et al.*, 1995). Avant le début du 20^{ième} siècle, la maladie d'Alzheimer est considérée comme un processus normal étant due à l'âge. Il faudra attendre 1910 pour que plusieurs cas avec des symptômes similaires à ceux d'Auguste Deter, chez qui les mêmes marqueurs pathologiques sont retrouvés, confirment les travaux d'Alois. C'est alors que le terme « maladie d'Alzheimer », nom donné par Emil Kraepelin, le directeur de recherche d'Alois Alzheimer, sera utilisé.

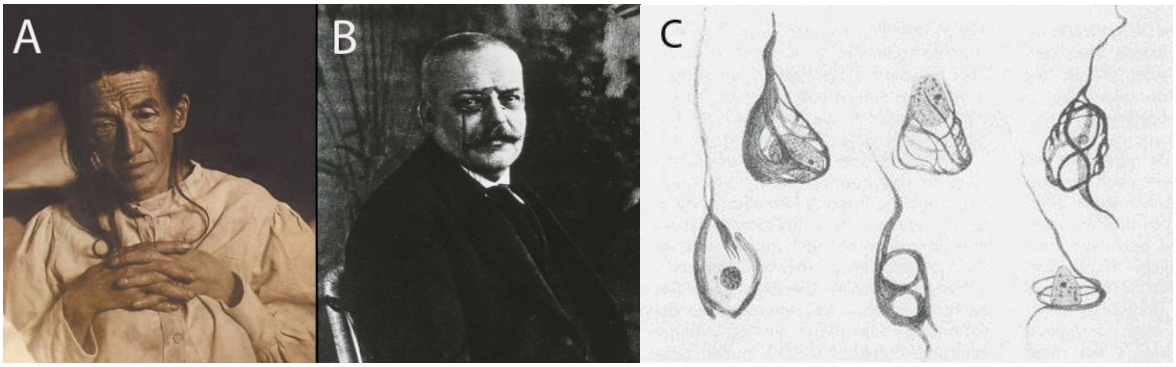

Figure 1 : Portrait d'Auguste Deter (A). Portrait de Alois Alzheimer photographié à Berlin (B). Dessin des dégénéréscences neurofibrillaires par Alois Alzheimer (C).
Source : (Maurer *et al.*, 1997).

1.2. Prévalence, origine et facteurs de risque

1.2.1. Prévalence

En 2018, **50 millions** de personnes vivaient avec une démence dans le monde et les prévisions sont de 82 millions en 2030, avec un nouveau cas toutes les 3 secondes (World Alzheimer Report 2018). Au Canada il y avait 564 000 personnes atteintes d'une maladie cognitive en 2016 (Société Alzheimer Canada 2016). D'après l'OMS, **60 à 70%** de ces cas sont des patients atteints de la MA. Malheureusement, la démence est plus difficilement diagnostiquée et prise en charge dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Le coût total dû aux démences de manière directe (coût des médicaments) et indirecte (services de soins de longue durée ou les journées de travail manquées par les proches pour s'occuper du patient), est de **1 billion de dollars US** en 2018 et il est estimé au double pour 2030 (World Alzheimer Report 2018). Au Canada le coût annuel était de 10,4 milliards de dollars CAN en 2016 (Société Alzheimer Canada 2016).

Cette forte augmentation du nombre de personnes atteintes de la MA est notamment dû à la hausse de l'espérance de vie qui augmente au fil des siècles (Wilmoth, 2000) et qui permet de révéler la prévalence de cette maladie, puisque le principal facteur de risque est l'**âge**. En effet, 86% des personnes atteintes de la MA ont 75 ans ou plus et environ 30 à 35% des personnes de 85 ans ou plus sont atteintes de la MA (Hebert *et al.*, 2013). Avant le 21^{ième} siècle, 18% des personnes âgées de 75 à 84 ans et 47,2% des personnes de plus de 85 ans étaient atteintes de trouble de la mémoire (Evans *et al.*, 1989). Malgré l'allure « épidémique » de la MA et 100 ans d'études, nous ne connaissons toujours pas l'origine des formes sporadiques.

1.2.2. Origine infectieuse ou génétique

1.2.2.1. Origine infectieuse

Pour expliquer l'origine de la MA, des infections ont été soupçonnées, mais d'autres maladies étaient en fait impliquées. Comme dans les années 1950, où une population avait développé une maladie similaire à la MA et à Parkinson et elle semblait se transmettre d'individu en individu par le biais de l'**endocannibalisme** (une coutume dans ce peuple). C'était en fait une maladie à **prion** comme celle transmise par la vache folle. Une autre « épidémie » s'est produite en 1980 au Canada, où de nombreuses personnes avaient des pertes cognitives importantes. Il s'est avéré qu'elles étaient dues à une **neurotoxine** trouvée dans les moules pêchées et consommées par la population concernée (Poirier et Gauthier, 2011). Cependant, des études récentes montrent que le virus de l'herpès pourrait aussi être un facteur de risque et pourrait même augmenter la pathologie amyloïde (Balin and Hudson, 2018; Lovheim *et al.*, 2019).

1.2.2.2. Origine génétique

Les **formes familiales** de la MA sont dues à des **mutations génétiques** qui se transmettent de génération en génération de manière dominante. Les formes génétiques familiales sont les plus **précoces** (se développent entre 30 et 50 ans) et à **progression rapide**. Les gènes actuellement identifiés sont le gène de la préséniline 1 (**PS1**), le gène de la préséniline 2 (**PS2**) et le gène de la protéine du précurseur de l'amyloïde (**APP** pour *amyloïde precursor protein* en anglais), qui mèneront avec certitude à la MA (Reitz and Mayeux, 2014). Les mutations les plus répandues sont celles sur PS1 (69%) puis sur le gène de l'APP (13%) avec la duplication de l'APP (7,5%) et plus rarement sur PS2 (2%) (Guyant-Marechal *et al.*, 2009). Les mutations sur le gène de l'APP peuvent, entre autres, augmenter la production de peptide amyloïde β (Aβ) ou favoriser la formation du peptide Aβ42 (Citron *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1994). Concernant les mutations sur PS1 et PS2, elles conduisent à une augmentation du ratio Aβ42/Aβ40 (Cruts and Van Broeckhoven, 1998; Chavez-Gutierrez *et al.*, 2012). **L'accumulation de Aβ** et en particulier de Aβ42, favorise la formation des agrégats insolubles retrouvés dans les **plaques amyloïdes** (voir 1.5.2.), un biomarqueur de la MA (Glenner *et al.*, 1984). Il y a aussi des prédispositions génétiques qui augmenteraient les risques d'être atteint de la MA et qui sont transmises à la descendance, mais ce sont seulement des facteurs de risque.

1.2.3. Facteurs de risque

Une étude d'association pangénomique (GWAS pour *genome-wide association studies* en anglais) a permis d'identifier plus de 20 gènes qui sont des facteurs de risque pour la MA. Le plus important est le gène de l'apolipoprotéine E avec l'allèle ε4 (**APO E4**), il augmente les risques de développer la MA mais en plus il avance l'âge de son apparition (Leduc *et al.*, 2010). Il existe aussi celui de l'apolipoprotéine J (**APO J**), du récepteur du complément de type 1 etc. (Reitz and Mayeux, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2016).

Concernant l'APO E, il existe 3 allèles différents, ε2, ε3 et ε4 qui codent pour 3 isoformes de la glycoprotéine ApoE. Normalement, la prévalence de l'allèle ε4 est environ de 15% tandis que les personnes atteintes de la MA portent cet allèle dans 40% des cas. Ainsi, le risque de développer la MA est doublé chez les individus qui portent un allèle ε4 et le risque est multiplié par 15 pour ceux qui expriment les deux allèles ε4 (Farrer *et al.*, 1997; Theendakara *et al.*, 2018). APO E peut lier Aβ et permettre la clairance de Aβ soluble et agrégé, mais cette clairance sera diminuée chez les porteurs de l'allèle ε4 (Deane *et al.*, 2008).
Cependant, les mutations causales et les facteurs de risque génétiques ne suffisent pas à expliquer l'origine de la MA et il existe de nombreux autres facteurs de risque.

En dehors des facteurs génétiques, nous avons vu que l'**âge** est également un facteur de risque majeur. **Les femmes** sont aussi plus susceptibles de développer la MA, avec un risque accru de 56% (Gao *et al.*, 1998). Cela peut s'expliquer par l'espérance de vie plus grande des femmes (Seshadri *et al.*, 1997), mais également par la chute drastique des estrogènes, neuroprotecteurs (Aenlle *et al.*, 2009), à la ménopause.

Le **diabète** et la **cigarette** seraient également des facteurs de risque plus importants que **l'hypertension** et les **maladies cardiovasculaires** (Luchsinger *et al.*, 2005). Le risque augmente de 39% chez les personnes diabétiques ou **hyperinsulinémiques** (Luchsinger *et al.*, 2004). Dans une étude, sur 265 patients atteints de démences, 22.3% étaient aussi diabétiques et le risque serait encore plus important chez les patients traités à l'insuline (Ott *et al.*, 1996). De plus, une méta-analyse montre que le diabète et **l'obésité** sont des facteurs de risque pour la MA (voir 3.), surtout s'ils sont développés en milieu de vie (Profenno *et al.*, 2010). Par contre, une alimentation riche en calories serait un risque surtout pour les porteurs de l'allèle ε4 de APO E (Luchsinger *et al.*, 2002).
Concernant les **maladies cardiovasculaires,** celles infracliniques sont liées à un risque plus élevé de 30%, de déclin cognitif important au cours des cinq années de suivi, même après exclusion des cas

d'accidents vasculaires cérébraux. Le déclin moyen de la fonction cognitive est d'ailleurs presque cinq fois plus important chez les patients atteints d'infarctus multiples par rapport aux infarctus simples (Stampfer, 2006).

Une étude a montré une corrélation entre **l'hypertension** en milieu de vie et le développement des plaques amyloïdes, des enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) et une atrophie cérébrale, les trois principales affections neuropathologiques de la MA (Petrovitch *et al.*, 2000).

Un **manque d'éducation** augmente le risque de développer la MA de 59 à 80% (Caamano-Isorna *et al.*, 2006) surtout chez les personnes qui ont réalisé moins de 12 ans de scolarité (Katzman, 1993). L'activité intellectuelle permettrait de protéger de la démence en créant des « réserves » cognitives (Valenzuela and Sachdev, 2006).

La connaissance de ces facteurs de risque est essentielle pour améliorer la prévention et espérer retarder l'apparition de la maladie ou ralentir sa progression.

1.3. Symptômes et diagnostic

1.3.1. Symptômes

Les symptômes de la MA peuvent se caractériser par les 4 A avec: **l'amnésie**, un trouble de la mémoire ; **l'aphasie**, un trouble du langage ; **l'apraxie**, un trouble du mouvement ; et **l'agnosie**, un trouble de l'identification. La maladie est caractérisée par 3 phases qui peuvent être divisées en 7 stades d'après la classification de l'Échelle de Détérioration Globale (Reisberg, 1984). Elle commence par une phase de symptômes **légers** avec une **petite perte** de mémoire, des difficultés à se souvenir d'un lieu, la perte d'objets, l'oubli de rendez-vous etc. Ensuite, il y a la **phase modérée** avec une **forte perte** des capacités cognitives et fonctionnelles où le patient commence à avoir besoin d'aide. Il peut faire preuve d'importants changements d'humeur, d'agressivité, de dépression et il peut ne plus reconnaître son entourage. Enfin, la phase **avancée** et **finale** correspond à une **perte** presque **totale** des capacités cognitives et fonctionnelles et des soins sont nécessaires 24 heures sur 24, 7 jours sur 7 (Forstl and Kurz, 1999). Les principales sources de décès sont les pneumonies d'aspiration et surviennent parfois 8 à 10 ans après la première phase.

1.3.2. Diagnostic

Le diagnostic de la MA est difficile à effectuer aux premiers stades. En général, c'est la famille du patient qui prend conscience des changements et demande à la personne d'aller consulter. Le médecin va chercher à connaître les antécédents familiaux du patient sur les cas de démences, les accidents vasculaires, mais aussi son niveau d'éducation et s'il est atteint de diabète ou d'obésité.

Un test cognitif simple peut être utilisé par le médecin comme le **MMSE** (pour *Mini mental state examination* en anglais) élaboré par le Dr Barry Reisberg et couramment utilisé de nos jours (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2015). Il permet d'étudier en 15 minutes la mémoire, l'apprentissage, l'attention, l'orientation, le langage et la motricité. Le **MoCA** (pour *Montreal Cognitive Assessment* en anglais), permet d'examiner plus en profondeur les capacités intellectuelles. Il a été établi par le Dr Ziad Nasreddine et il permet d'étudier les capacités exécutives (Nasreddine *et al.*, 2005). Ces deux tests sont sur 30 points et sont considérés comme normaux lorsque les résultats sont supérieurs à 26. La **NINCDS-ADRDA** (pour *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* en anglais), permet de poser les principaux critères du diagnostic de la MA qui combinent les résultats cliniques et neuropathologiques. Elle permet d'assigner 3 types de diagnostics pour la MA fiable à 90% : possible, probable et certain (McKhann *et al.*, 1984).

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour confirmer le diagnostic et éliminer les autres maladies. Par exemple, un ***scan* du cerveau sans colorant** permet d'éliminer les cas de tumeurs ou de thromboses cérébrales et une **prise de sang** permet de vérifier qu'il n'y a pas d'anémie, de problème de la thyroïde ou un manque de vitamines comme la B_{12} (Poirier et Gauthier, 2011). **L'imagerie par résonnance magnétique** permet de voir s'il y a une atrophie cérébrale très tôt dans le développement de la MA (Vemuri and Jack, 2010) ou de petits infarctus. Une tomographie à émission de positrons avec fluorodéoxyglucose (**TEP-FDG**) peut également être effectuée pour voir si le sucre radioactif injecté est moins utilisé, ce qui traduit une diminution du métabolisme et donc indirectement une perte neuronale. Cette baisse du métabolisme est présente avant les premiers symptômes (Reiman *et al.*, 2004). Il existe aussi la **TEP avec ligands pour le peptide β-amyloïde** (Carswell *et al.*, 2018) et **pour la protéine tau** (Okamura *et al.*, 2018), qui permettent de détecter les marqueurs de manière précoce. Mais le coût des TEP est élevé. Enfin, une **ponction lombaire**, moins utilisée chez les personnes âgées car c'est une procédure lourde à supporter, permet de mesurer les marqueurs de la MA : le taux de Aβ, de tau totale et de tau phosphorylée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Olsson *et al.*, 2016).

1.4. Traitements et préventions

1.4.1. Traitements

La première étape, visant à retarder l'apparition de la MA et débutant dès les premiers stades, est appelée **prévention primaire**. Un retard de 5 ans dans l'apparition des symptômes permettrait de diviser par 2 le nombre de personnes atteintes en moins de 50 ans. Il suffirait donc de diminuer les facteurs de risque en améliorant nos connaissances à leur sujet. Par exemple, un **contrôle de l'hypertension** artérielle pendant 5 ans diminue de moitié le risque de démence d'après l'étude de SystEur dirigée par le Dr François Forette à Paris (Forette *et al.*, 2002). Au stade 3, un **entraînement intellectuel** pourrait ralentir le déclin cognitif. Les résultats obtenus par le Dr Sylvie Belleville à Montréal sont très encourageants puisqu'elle observe une amélioration des performances cognitives sur les exercices pour lesquels les personnes se sont entraînées (Belleville, 2008). Ensuite, au stade 4, les traitements proposés permettent de diminuer certains symptômes et facteurs de risque. Par exemple, des **antidépresseurs**, comme la trazodone, sont prescrits aux personnes dépressives et la trazodone permet aussi de diminuer les problèmes de sommeil, ce qui peut ralentir le déclin cognitif (La *et al.*, 2019). Des **antipsychotiques** comme la rispéridone sont prescrits aux personnes qui ne reconnaissent plus leur maison ou leurs proches. Mais les antipsychotiques augmentent légèrement le risque de pneumonies et d'accidents vasculaires cérébraux (Shin *et al.*, 2013; Tolppanen *et al.*, 2016).

Il existe **3 traitements** en Amérique pour améliorer les capacités cognitives : le **donépézil**, la **rivastigmine** et la **galantamine**. En effet, dans la MA il y aurait une défaillance de la voie cholinergique. Ces traitements permettent d'inhiber les acétylcholinestérases, des enzymes qui dégradent l'acétylcholine, un neurotransmetteur (NT) impliqué dans la mémoire et l'apprentissage (Hampel *et al.*, 2018). Ces traitements permettent l'amélioration de l'état de certaines personnes qui vont retrouver l'envie et la passion pour certaines activités voir une légère amélioration de la mémoire et de l'apprentissage (Birks, 2006; Birks *et al.*, 2015; Birks and Harvey, 2018). Au stade 5 et 6, la **mémantine** peut être ajoutée aux inhibiteurs de l'acétylcholine et elle a un effet sur la cognition, l'humeur et l'autonomie (Areosa *et al.*, 2005). Cette molécule agit sur les récepteurs du glutamate, un autre NT impliqué dans la mémoire et l'apprentissage (Rogawski and Wenk, 2003). Cependant, il est important de noter que ces traitements ciblent seulement les symptômes de la MA et non la cause, et qu'en plus de n'être que légèrement efficace sur certaines personnes, ils ont des effets secondaires graves comme des risques cardiaques pour la rivastigmine (Khoury *et al.*, 2018). Ils ne sont d'ailleurs plus remboursés en France (France Alzheimer, 2018).

L'**aromathérapie,** la **musicothérapie** et la **zoothérapie** sont aussi des moyens qui semblent aider les personnes atteintes de la MA. Au stade 7, les traitements ne sont plus efficaces et il faut passer aux **soins palliatifs**.

1.4.2. Préventions

À cause du manque de traitements pour la MA et aux vues des nombreux facteurs de risque présents, les chercheurs ont tenté de trouver des facteurs de protection tels que les **agents antihypertenseurs** (Yasar *et al.*, 2013) et les **agents réducteurs du cholestérol sanguin**, comme l'atorvastatine (Sparks *et al.*, 2005). Les agents **anti-inflammatoires non stéroïdiens** (Wang *et al.*, 2015), le **vin rouge**, **l'alimentation**, l'**exercice physique et intellectuel** sont aussi des facteurs de protection (Hersi *et al.*, 2017). Cependant d'autres études sont nécessaires puisqu'elles ne sont pas ou peu reproductibles.

Nous ne connaissons pas les effets exacts des **anti-inflammatoires** sur la MA, mais une étude épidémiologique sur 50 paires de jumeaux a montré que les personnes atteintes d'arthrite et donc suivant un traitement d'anti-inflammatoire, ne développaient pas la maladie ou alors beaucoup plus tard que leurs jumeaux sans traitement (Breitner *et al.*, 1994).

Le **vin rouge** serait légèrement protecteur car il contient des polyphénols (comme le resvératrol) qui sont des antioxydants permettant d'interférer dans le processus d'oxydation des lipides (Luchsinger and Mayeux, 2004). De plus, le resvératrol pourrait avoir une action directe sur Aβ et tau, permettant de diminuer la pathologie de la MA (Ahmed *et al.*, 2017).

Concernant **l'exercice physique**, une étude a montré que la pratique d'une activité physique modérée (environ 3 fois par semaine) pendant 6 ans, permettrait de retarder significativement les symptômes de la MA (Larson *et al.*, 2006).

L'entraînement intellectuel permettrait une amélioration des capacités cognitives dans les tâches pour lesquelles les personnes s'entraînent et un effet sur les tests intellectuels a pu être décelé après 5 ans tandis que l'effet sur les tests de mémoire a pu être décelé après 1 an (Willis *et al.*, 2006; Belleville, 2008).

Au niveau de **l'alimentation**, le régime de type méditerranéen riche en poissons, en huile d'olive, en légumes et fruits frais semble diminuer les risques liés à l'âge sur les capacités intellectuelles notamment grâce à la consommation modérée d'acides gras monoinsaturés et d'acides gras

polyinsaturés, surtout d'omega-3 (Frisardi *et al.*, 2010). Une supplémentation en omega-3 semble plus efficace lorsqu'elle est effectuée dans les premiers stades de la MA (Canhada *et al.*, 2018).

1.5. Affections neuropathologiques

Bien qu'il soit difficile de poser un diagnostic certain au cours de la maladie, il existe différentes affections neuropathologiques, caractéristiques de la MA, qui le permettent : comme l'atrophie cérébrale et l'altération du métabolisme du glucose. D'autres affections permettent de poser un diagnostic certain, mais *post-mortem* : comme les plaques amyloïdes β et les enchevêtrements neurofibrillaires.

1.5.1. Atrophie cérébrale

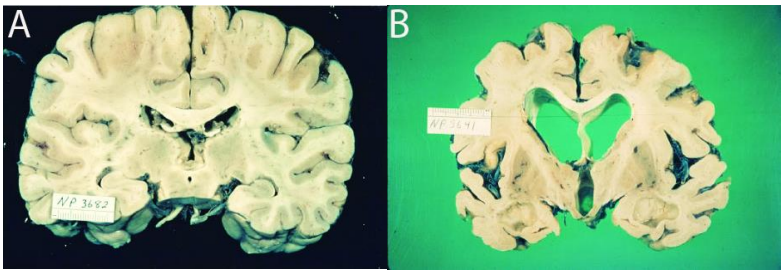

Figure 2 : Image de l'atrophie cérébrale et de la dilatation des ventricules cérébraux.
Comparaison d'un cerveau sain (A) avec un cerveau d'un patient atteint de la MA (B). Source : (Bird, 2008).

Comme Alois Alzheimer l'a décrit il y a plus de 100 ans, le cerveau des patients atteints de la MA subissent une perte neuronale, accompagnée d'une atrophie cérébrale et d'une dilatation des ventricules cérérbaux (Figure 2). Ce phénomène arrive également à cause de l'âge (Madan and Kensinger, 2016) et il est donc difficile de dire si l'atrophie est due à l'âge ou aux premiers stades de la MA. Cependant, un suivi sur deux ans permet de montrer qu'une atrophie plus marquée et plus diffuse est caractéristique de la MA (Fox *et al.*, 1996; Fiford *et al.*, 2018). L'atrophie corticale affecte très tôt le **lobe temporal médian** (composé du cortex entorhinal, de l'amygdale et de l'hippocampe) et s'étend au reste du cortex en suivant une trajectoire fronto-tempo-pariétale. Les zones motrices sont épargnées jusqu'à un stade avancé de la MA. L'atrophie de **l'hippocampe** est la plus caractéristique et la plus utilisée pour évaluer la progression de la maladie. Son volume peut diminuer de 15 à 40% chez les patients atteints de la MA comparé aux contrôles. Dans les stades modérés de la MA, le volume de **l'amygdale** peut diminuer de 20% à 35%. De plus, le **thalamus** est également réduit de manière bilatérale de 12%, sa région ventro-médiane est affectée en premier puis l'atrophie s'étend aux régions antérieures. Pour finir, les régions atrophiées semblent corréler avec les régions où se répandent les NFTs (Pini *et al.*, 2016).

1.5.2. Altération du métabolisme du glucose

Comme présentée dans la partie diagnostic, une TEP-FDG permet d'identifier une diminution du métabolisme du glucose dans la MA (Abolhassani *et al.*, 2017). En effet, une **baisse de 20 à 25% du métabolisme du glucose** est observée chez les patients atteints de la MA (Cunnane *et al.*, 2011). Or, 25% du glucose métabolisé est utilisé par le cerveau et il est transporté *via* le plasma à travers la barrière hématoencéphalique (BHE). C'est le transporteur de glucose (GLUT pour *glucose transporter* en anglais) 1, qui se trouve sur la BHE, qui va permettre le passage du glucose dans le cerveau. Le GLUT 3, qui est un transporteur indépendant de l'insuline, comme GLUT 1, permet l'entrée du glucose dans les neurones (Watson and Craft, 2004). Une **diminution de ces transporteurs** a été observée chez les patients atteints de la MA, pouvant expliquer la diminution du métabolisme du glucose dans le cerveau (Simpson *et al.*, 1994). Cette diminution de GLUT 1 et GLUT 3 a également été observée dans les neurones de souris après un régime riche en gras, comparé à un régime contrôle et elle est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation de tau (Kothari *et al.*, 2017).

La diminution du métabolisme du glucose est plus importante dans les cortex cingulaire postérieur et pariétotemporal (incluant l'hippocampe et le cortex entorhinal) et s'étend aux zones frontales dans les stades avancées. Le cervelet, les noyaux thalamiques et les noyaux gris centraux semblent être épargnés (Mosconi, 2005). De plus, une diminution dans l'expression et la fonction du facteur de croissance cérébral et de son récepteur a été associée à une diminution croissante du degré de liaison de l'insuline aux récepteurs IGF (*pour insulin-like growth factor* en anglais) I et II, ainsi qu'une diminution des taux d'ATP et de l'expression de la choline acétyltransférase en fonction des stades de Braak (voir 1.5.4), qui correspondent à l'avancée de la MA (Rivera *et al.*, 2005).

Au niveau périphérique, l'altération du métabolisme du glucose et de l'activité de l'insuline semble également contribuer au déclin cognitif chez les patients atteints de la MA. Chez des patients sans diabète mais avec une mauvaise régulation du glucose, il peut y avoir un déficit cognitif mesuré avec le MMSE (Watson and Craft, 2004). Chez les patients atteints de diabète de type 2 (DT2), un déficit cognitif a également été reporté dans certains domaines (langage et fonctions exécutives) (Palta *et al.*, 2017). Cependant, une revue systématique montre que seulement 2 articles sur les 10 inclus supportent cette hypothèse (Li *et al.*, 2017).

1.5.3. Plaques amyloïdes

1.5.2.1. Formation

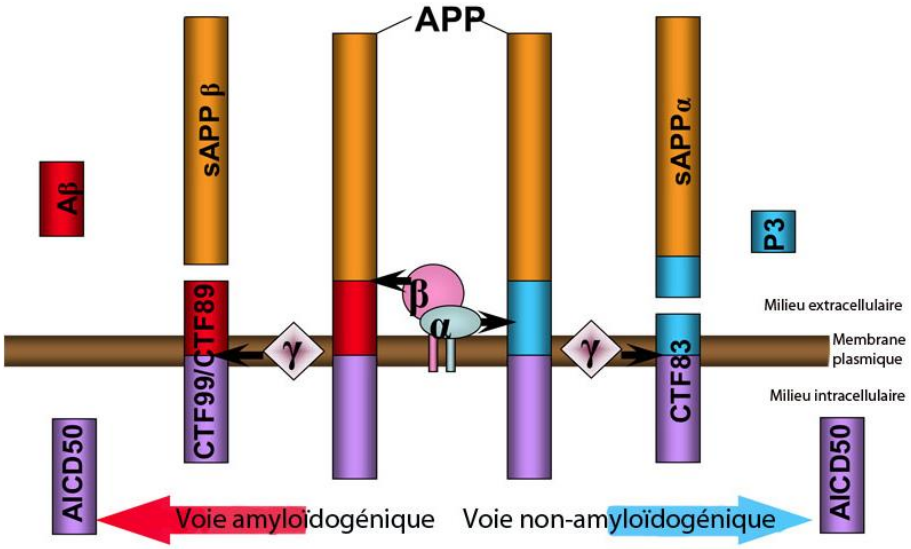

Figure 3 : Schéma des deux voies de clivage de la protéine du précurseur de l'amyloïde.
La voie amyloïdogénique qui nécessite la β-sécrétase et la γ-sécrétase va conduire à la formation d'Aβ et la voie non amyloïdogénique nécessite l'α-sécrétase et la γ-sécrétase. Adapté de : (Chow *et al.*, 2010).

Si les plaques séniles étaient associées à un phénomène dû à l'âge, avant les recherches d'Alois Alzheimer, elles sont maintenant également associées à la MA. Leur composition est étudiée en 1984 par George Glenner qui montre que les plaques sont constituées du peptide amyloïde β (Aβ) (Glenner and Wong, 1984; Glenner *et al.*, 1984). Le gène de l'**APP** est localisé sur le chromosome 21. Il existe deux voies pour le clivage de l'APP qui dépendent de l'enzyme sécrétase en jeu (Figure 3). La **voie non-amyloïdogénique** qui implique l'α-sécrétase et la γ-sécrétase et la **voie amyloïdogénique** qui implique la β-sécrétase et la γ-sécrétase. Cette dernière voie permet de libérer l'**Aβ** en extracellulaire (Haass *et al.*, 2012; Wilkins and Swerdlow, 2017).

L'Aβ peut être constitué de 39 à 43 aa mais ce sont les formes Aβ40 (avec 40 aa) et Aβ42 (avec 42 aa) que nous retrouvons le plus. Aβ40 représente 90% des formes totales de Aβ et Aβ42 représente presque les 10% restant (Li *et al.*, 2000; Van Cauwenberghe *et al.*, 2016). **Aβ42** favoriserait la formation de **plaques amyloïdes** (Figure 4.A.) à cause de ses capacités agrégatives, tandis que Aβ40 inhiberait cette formation (Jarrett *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2007).

L'accumulation de Aβ, suite à un déséquilibre dans sa clairance ou un déséquilibre dans les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique, favorise la formation des monomères, des dimères, des

oligomères puis des polymères de Aβ, jusqu'à la formation des agrégats insolubles qui constituent les plaques amyloïdes (Selkoe, 2000).

1.5.2.2. Aβ dans la MA

De nombreux arguments sont en faveur de **l'hypothèse de la cascade amyloïde** qui stipule que la pathologie amyloïde serait à l'origine de la MA. Le terme plus exact serait d'ailleurs cascade Aβ puisque l'origine serait l'accumulation d'Aβ. Parmi ces arguments se trouve celui des mutations familiales qui sont retrouvées dans les formes précoces de la MA. Ces mutations impactent le clivage de la γ-sécrétase précisément sur les sites catalytiques de la PSEN1 et PSEN2, entraînant une augmentation du niveau de Aβ42 produit qui mènerait à la MA (Selkoe and Hardy, 2016). Cependant, beaucoup d'études ont examiné la corrélation entre la déficience cognitive et le nombre de plaques qui est moins pertinente que la perte synaptique (Walsh and Selkoe, 2004). De plus, il se pourrait que les plaques amyloïdes ne soient pas l'espèce toxique mais plutôt un réservoir de protection contre les oligomères qui seraient eux, toxiques (Walsh *et al.*, 2002; Walsh and Selkoe, 2004).

Concernant **l'évolution spatio-temporelle** (Figure 4.B.) des plaques amyloïdes dans la MA, elles vont d'abord se développer dans le **néocortex en phase 1** puis s'étendre au **cortex entorhinal**, à **l'hippocampe** et **au gyrus cingulaire en phase 2**. Ensuite, d'autres plaques amyloïdes deviennent détectables dans le **striatum**, **l'hypothalamus**, le **thalamus** et le **cerveau antérieur basal en phase 3**. Ces phases précèdent les premiers symptômes de la MA. Les plaques vont ensuite être trouvées dans le **mésencéphale** et le **bulbe rachidien en phase 4** et enfin dans le **cervelet** et le **pont en phase 5** (Thal *et al.*, 2015).

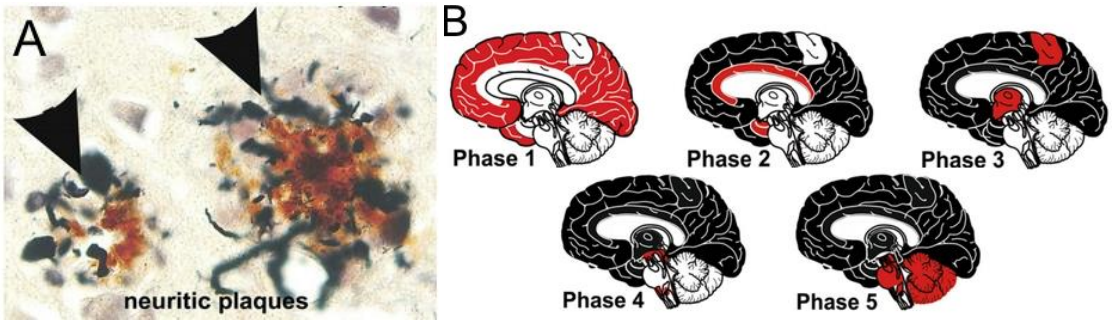

Figure 4 : Image des plaques neuritiques (A) et schéma de l'évolution spatio-temporelle de la pathologie amyloïde (B).
En rouge : nouvelles zones atteintes. En noir : anciennes zones atteintes. Adapté de : (Thal *et al.*, 2015).

1.5.4. Enchevêtrements neurofibrillaires

La nature des **enchevêtrements neurofibrillaires** (aussi appelés dégénérescences neurofibrillaires), a été étudiée par Jean-Pierre Brion, qui a montré qu'ils étaient constitués de la protéine tau anormalement phosphorylée (Brion *et al.*, 1985). Les NFTs sont constitués de filaments appariés en hélices (**PHFs** pour *paired helical filaments* en anglais) de la protéine tau hyperphosphorylée (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995) ou anormalement phosphorylée (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Il existe trois états dans la formation des NFTs (Figure 5), les **pré-NTFs**, les NFTs intra-neuronaux (**iNFTs**) et les NFTs extra-neuronaux (**eNTFs**). Kimura *et al*. ont étudié le développement de la phosphorylation de la molécule tau dans les 3 types de NFTs et ils ont montré que tau était phosphorylée sur différents épitopes selon le stade de NFTs, permettant leur identification (Kimura *et al.*, 1996). Les pré-NFTs sont définis comme étant diffus dans le cytoplasme des neurones qui ont un noyau détectable et une morphologie générale normale (Figure 5). Les iNFTs sont également situés dans le cytoplasme, où ils présentent des structures filamenteuses agrégées et le noyau, bien que présent, est souvent déplacé par inclusion. Dans une eNFT, un ensemble de fibrilles extracellulaires sous la forme d'un corps cellulaire neuronal est observé et il n'y a plus de noyaux ou de dendrites (Augustinack *et al.*, 2002).

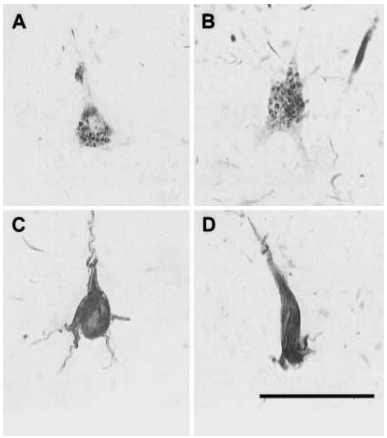

Figure 5 : Image de l'évolution des enchevêtrements neurofibrillaires.
Image des pré-NFTs (A et B), des iNFTs (C) et des eNFTs (D) dans le cortex entorhinal. Échelle : 50µm. Source : (Augustinack *et al.*, 2002).

Si Aβ semble être à l'origine de la MA, le déclin cognitif corrèle plus avec le taux de NFTs qu'avec celui des plaques amyloïdes chez les patients atteints de la MA (Giannakopoulos *et al.*, 2003; Bretteville and Planel, 2008). Braak *et al*., ont déterminé différents stades correspondant à **l'évolution spatio-temporelle** de l'accumulation des NFTs (Figure 6). Celle-ci commence très tôt dans la région **trans-entorhinale** au **stade I** et s'étend à la région entorhinale et à l'hippocampe au **stade II,** mais ne touche qu'une partie de ces deux régions. Les deux premiers stades représentent la période préclinique de la MA et les symptômes cliniques ne sont pas encore présents. Ensuite, les NFTs sont

observées dans tout **l'hippocampe** et la région entorhinale, ainsi que légèrement au niveau du gyrus occipito-temporal au **stade III**. Au stade suivant (**IV**), les NFTs sont très présents au niveau du gyrus occipito-temporal et s'étendent au **lobe temporal**. Les symptômes cliniques apparaissent à ces deux stades. Aux **phases V et VI**, les NFTs touchent presque tout le **néocortex** ainsi que le lobe occipital avec une atteinte des aires primaires et secondaires (Braak and Braak, 1991; Bretteville and Planel, 2008; Braak *et al.*, 2011).

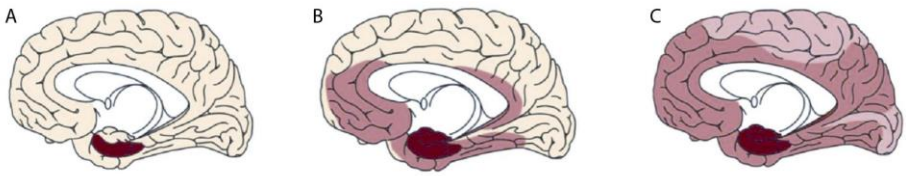

Figure 6 : Schéma de l'évolution spatio-temporelle de la pathologie tau.
Stade I et II : région trans-entorhinale et hippocampe (A). Stade III et IV : lobe temporal et aires limbiques (B). Stade V et VI : tout le cortex (C). Adapté de : (Braak *et al.*, 2011).

Parmi toutes ces affections neuropathologiques de la MA, nous avons décidé d'étudier la protéine tau pour caractériser cette maladie dans nos modèles murin. En effet, en plus d'être un biomarqueur *post-mortem*, c'est la pathologie tau qui corrèle le mieux avec le déclin cognitif dans la MA. C'est pourquoi nous allons voir plus en détails les caractéristiques de cette protéine tau.

2. La protéine tau

2.1. Structure

2.1.1. Gène tau et isoformes

La protéine tau humaine est codée par le gène **MAPT** (pour *microtubule associated protein tau* en anglais) situé sur le chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986). Le gène comprend 16 exons (Figure 7) mais les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits. Ensuite, un épissage alternatif va permettre la production de **6 isoformes** de tau en fonction de la présence ou non des exons 2, 3 et 10, sachant que l'exon 3 n'est jamais présent sans l'exon 2. Les exons 4A, 6 et 8 sont transcrits uniquement dans le système nerveux périphérique et la présence de l'exon 4A génère la « big tau » (Georgieff *et al.*, 1993). Les exons 9 à 12 codent pour le domaine de liaison aux microtubules (MTBD pour *microtubule binding domain* en anglais) avec 4 domaines répétés (**4R**) ou seulement 3 (**3R**) lorsque l'exon 10 est épissé. Du côté de l'extrémité N-terminale (Amino-terminale), la présence des exons 2 et 3 va donner les isoformes **2N**, la présence de l'exon 2 donne les isoformes **1N** et l'absence de l'exon 2 et 3 donne les isoformes **0N** (Wang and Mandelkow, 2016).

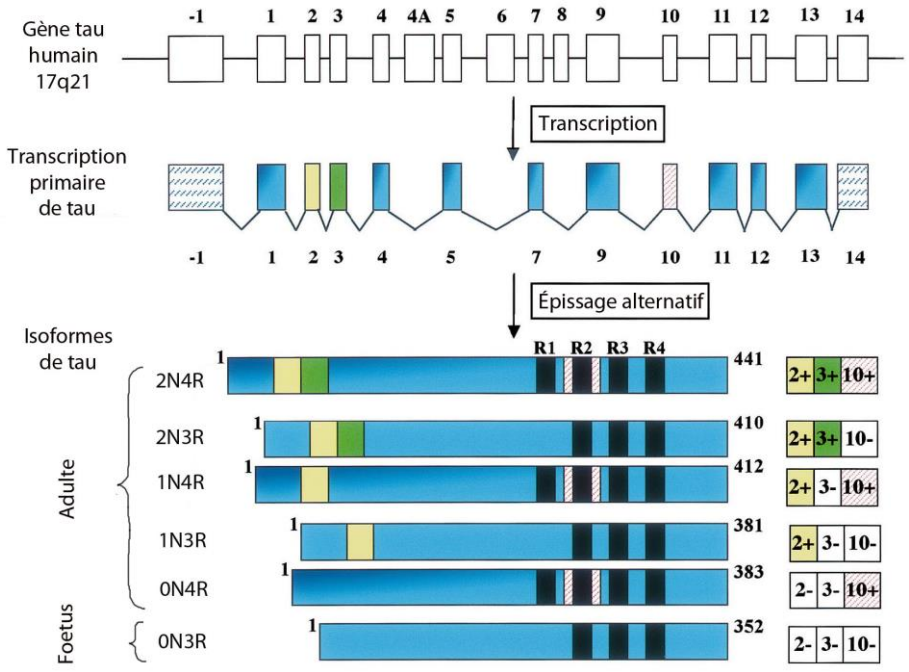

Figure 7 : Schéma des 6 isoformes de la protéine tau.
Les différentes étapes permettant la production des 6 isoformes à partir de l'épissage alternatif du gène tau. Adapté de : (Buee *et al.*, 2000).

Les 6 isoformes sont exprimées chez l'Homme adulte tandis que chez le fœtus, seule l'isoforme 0N3R est exprimée. Le **ratio 3R:4R** est de **1** chez un adulte en bonne santé mais aussi chez les patients atteints de la MA (Goedert *et al.*, 1989). La quantité d'isoformes 0N, 1N et 2N n'est pas proportionnelle puisqu'elles représentent respectivement 37, 54 et 9% des protéines tau totales du système nerveux central (SNC). Cependant, chez la souris, seules les isoformes 3R sont retrouvées chez le fœtus et les isoformes 4R sont retrouvées chez l'adulte (Kosik *et al.*, 1989).

2.1.2. Structure et conformation

La protéine tau fait entre 45 et 65 kDa et est divisée en 4 domaines. Si nous considérons l'isoforme 2N4R de tau, la partie N-terminale qui va de l'aa 1 à 150 est un domaine de projection acide (Figure 8). Ensuite, il y a un domaine riche en proline (PRD pour *proline-rich domain* en anglais) qui s'étend de l'aa 151 à 243 puis le MTBD qui va de l'aa 244 à 369. Enfin, la partie C-terminale va de l'aa 370 à 441. La protéine tau a une conformation très flexible et présente peu de structures secondaires. Cependant, sous sa forme soluble, elle aurait une conformation en « trombone » avec l'extrémité C se repliant sur le domaine de liaison aux microtubules (MTs) et l'extrémité N se repliant sur l'extrémité C, amenant les deux extrémités à proximité (Guo *et al.*, 2017).

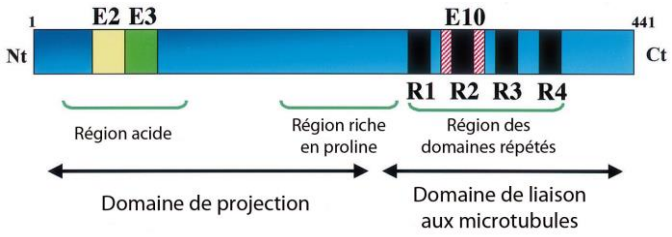

Figure 8 : Schéma des domaines fonctionnels de l'isoforme 2N4R de tau.
Il existe 4 domaines sur la protéine avec le domaine acide en N terminal, un domaine riche en proline, un domaine de liaison aux microtubules et enfin la partie C-terminale. Adapté de : (Buee *et al.*, 2000)

2.2. Modifications post-traductionnelles de tau

2.2.1. Phosphorylation

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus couramment décrite. La protéine tau contiendrait jusqu'à **85 sites de phosphorylations** (Figure 9) avec 45 sérines, 35 thréonines et 5 tyrosines, qui correspondent respectivement à 53, 41 et 6% des sites phosphorylables de tau. La phosphorylation de tau est permise par un grand nombre de kinases (Hanger *et al.*, 2009) mais nous allons voir seulement celles utilisées dans l'article ou citées dans l'annexe 3. La plus commune est la

kinase glycogène synthase (**GSK** pour *glycogen synthase kinase* en anglais) **3β** (Wang *et al.*, 1998). Il y a également **Akt**, aussi appelée protéine kinase B (Ksiezak-Reding *et al.*, 2003), la kinase dépendante des cyclines 5 (**Cdk5** pour *cyclin-dependant kinase* en anglais) (Baumann *et al.*, 1993), **p38**, **JNK** (pour *c-Jun N-terminal kinase* en anglais) (Goedert *et al.*, 1997), les **ERK** (pour *Extra-cellular signal regulated kinase* en anglais) (Drewes *et al.*, 1992) et **CaMKII** (pour *calcium/calmodulin-dependent-kinase II* en anglais) (Baudier and Cole, 1988). De plus Akt inhibe GSK3β et est elle-même inhibée par le phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Cross *et al.*, 1995). GSK3β est la kinase la plus commune car elle peut cibler 40 sites sur tau, dont au moins 29 sont phosphorylés dans la MA (Hanger *et al.*, 2009).

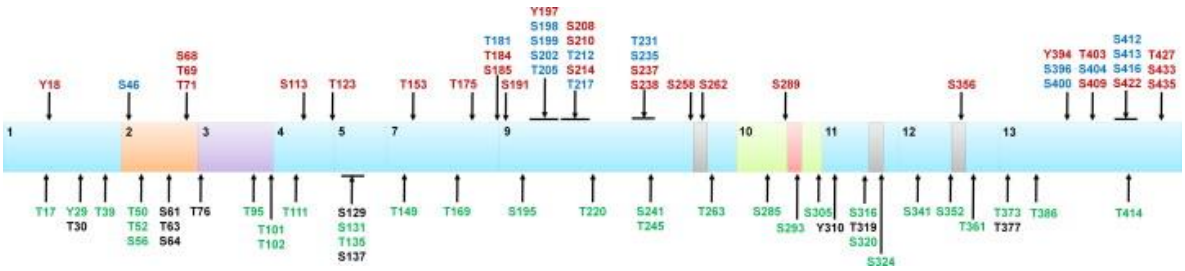

Figure 9 : Schéma des 85 sites de phosphorylation de la protéine tau sur l'isoforme 2N4R.
Représentation des sites phosphorylables de tau dans un cerveau sain (en vert), dans les tauopathies (en rouge) et dans les deux cas (en bleu). En noir ce sont les sites théoriques qui n'ont jamais été prouvé. Source : (Martin *et al.*, 2011).

2.2.2. Déphosphorylation

La protéine phosphatase 2A (PP2A) représente plus de 70% de l'activité des phosphatases du cerveau et permet de déphosphoryler tau. PP1, PP5 et la calcineurine (PP2B) sont aussi des phosphatases de tau avec respectivement 11, 10 et 7% de l'activité totale des phosphatases sur la protéine tau (Liu *et al.*, 2005). L'activité de PP2A est diminuée de 20% chez les patients atteints de la MA (Gong *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1995). De plus, PP2A peut déphosphoryler GSK3β sur sa sérine S9 (Lee *et al.*, 2005) la rendant active et elle peut diminuer l'activation de ERK, JNK (Kins *et al.*, 2003) et CaMKII (Bennecib *et al.*, 2001). GSK3β active peut aussi inhiber PP2A en la phosphorylant (Yao *et al.*, 2011).

Il existe donc un équilibre entre les kinases et les phosphatases qui pourrait être rompu en conditions pathologiques et qui pourrait expliquer l'augmentation de la phosphorylation de tau. En effet, en conditions pathologiques, l'état de phosphorylation de tau est altéré, ce qui conduit à une réduction de son affinité avec les MTs, à une déstabilisation du cytosquelette et à une perte des fonctions qui leur sont liées. De plus, la protéine tau hyperphosphorylée ou anormalement phosphorylée libre va

alors s'agréger, formant des oligomères puis des agrégats qui vont donner les NFTs (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

2.2.3. Autres modifications

Il existe de nombreuses autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la N-glycosylation qui peuvent faciliter la phosphorylation de tau tandis que la O-glycosylation peut protéger de l'hyperphosphorylation par ajout d'un oligosaccharide sur une sérine ou une thréonine. Il existe aussi la glycation, la désamidation, l'isomérisation que nous retrouvons seulement dans le cerveau de patients atteints de la MA, la nitration également observée dans la MA et dans d'autres pathologies tau, ainsi que l'ubiquitination et la méthylation (Guo *et al.*, 2017).

Toutes ces modifications post-traductionnelles physiologiques de tau vont lui permettre de remplir ses différents rôles selon sa localisation dans le neurone.

2.3. Localisation et fonction de tau

2.3.1. Localisation

En conditions physiologiques, la protéine tau est exprimée dans les neurones, principalement liée aux MTs au niveau axonal (Binder *et al.*, 1985) et de manière moins importante, dans les oligodendrocytes et les astrocytes (Muller *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 2010). Au niveau des neurones, tau est aussi retrouvée en faible quantité dans le compartiment somato-dendritique et nucléaire (Papasozomenos and Binder, 1987; Tashiro *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2017).

2.3.2. Régulation de la dynamique des microtubules

Les MTs sont constitués de protofilaments formés d'hétérodimères de tubuline α et β (Burns and Surridge, 1994). Ces MTs sont dynamiques et peuvent se polymériser à une extrémité et se dépolymériser à une autre, en fonction de leur polarité. La partie N-terminale de tau aurait un rôle dans la régulation de cette dynamique et influence la liaison ou le détachement des MTs avec d'autres composants de la cellule (Chen *et al.*, 1992). Les domaines répétés du MTBD permettent l'interaction entre tau et les MTs tandis que les séquences entre ces domaines permettent la régulation de ces interactions (Mukrasch *et al.*, 2007). Les isoformes 4R de tau ont une meilleure affinité que les 3R (Goedert and Jakes, 1990) grâce à une séquence entre R1 et R2 (Figure 8) qui augmente l'affinité de tau pour les MTs, or R2 n'est présent que dans les formes 4R (Goode and Feinstein, 1994).

Cependant, l'augmentation de la phosphorylation de tau diminue cette affinité, surtout si la phosphorylation a lieu sur les domaines de répétitions et plus particulièrement sur la sérine 262 (Biernat *et al.*, 1993). De plus, la protéine tau permet d'augmenter la vitesse d'élongation des MTs (Witman *et al.*, 1976).

Il est donc acquis que tau a un rôle dans la dynamique des microtubules, pourtant les souris sans MAPT sont viables, fertiles et sans altération des fonctions cérébrales, excepté une légère diminution du nombre de MTs dans les petits axones. Une surexpression de MAP1A (pour *microtubule associated protein 1A* en anglais) a été rapportée pouvant expliquer la viabilité des souris, grâce à une compensation *via* d'autres MAPs (Harada *et al.*, 1994; Fujio *et al.*, 2007).

2.3.3. Autres rôles de tau

Rôle dans le cytosquelette : Tau est aussi capable de lier simultanément l'actine et la tubuline ce qui permet une croissance couplée de ces deux réseaux (Elie *et al.*, 2015). Cette liaison se fait grâce au domaine riche en proline de la protéine tau (Correas *et al.*, 1990).

Rôle dans le transport axonal : Les kinésines assurent un transport antérograde, c'est-à-dire du soma vers la terminaison cellulaire, et le complexe dynéine/dynactine assure un transport rétrograde (Martin *et al.*, 1999). La surexpression de tau inhibe le transport antérograde par liaisons compétitives avec les kinésines sur les MTs (Mandelkow *et al.*, 2003) tandis qu'il favorise le transport rétrograde. La région N-terminale de tau interagit avec le domaine de projection de la dynactine et permet sa liaison avec les MTs (Magnani *et al.*, 2007).

Rôle dans la signalisation cellulaire : Le PRD fournit de nombreux sites pouvant être reconnus par le domaine d'homologie Src 3 (SH3 pour *Src homology-3* en anglais) qui se trouve dans différentes kinases telles que Lck, Fyn, PI3K, phospholipase C etc. (Morris *et al.*, 2011). De plus, la phosphorylation influe sur l'interaction de tau avec la membrane plasmique puisque seules les formes déphosphorylées y sont retrouvées associées (Maas *et al.*, 2000). Donc une hyperphosphorylation va altérer le rôle de tau dans la signalisation cellulaire et promouvoir son agrégation (Pooler and Hanger, 2010).

Rôle dans la maturation et la plasticité synaptique : La protéine tau située dans les dendrites permettrait la régulation de la plasticité synaptique des neurones de l'hippocampe en réponse à un facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Chen *et al.*, 2012). Elle aurait aussi un rôle dans la

maturation synaptique et morphologique des neurones granulaires de l'hippocampe des souris nouveaux nés et elle permettrait la bonne formation des densités post-synaptiques et des épines dendritiques des souris adultes (Pallas-Bazarra *et al.*, 2016). De plus, les souris vont exprimer un déficit dans la dépression à long terme, donc même s'il n'y a pas de déficit dans la potentialisation à long terme, tau a un bien un rôle dans la plasticité synaptique (Kimura *et al.*, 2014).

Rôle dans la fonction nucléaire : Tau se fixe au petit sillon de la double hélice d'ADN (pour Acide désoxyribonucléique) *via* le PRD et le MTBD (Wei *et al.*, 2008) Cette liaison à l'ADN permet d'augmenter sa température de fusion ou encore de protéger l'ADN contre des lésions induites par un radical hydroxyle (Camero *et al.*, 2014) ou contre le stress thermique (Sultan *et al.*, 2011). Tau pourrait avoir un rôle dans la protection du génome au niveau de l'expression des gènes et elle contribuerait à la stabilisation des chromosomes (Rossi *et al.*, 2013). De plus, tau aurait un rôle dans l'organisation nucléolaire et la mitose car elle a été retrouvée dans le noyau pendant l'interphase (Thurston *et al.*, 1996).

Rôle dans la migration neuronale et la croissance neuronale: L'absence de tau conduit à une diminution de la migration des neurones en développement dans l'hippocampe, suggérant un rôle de tau dans la migration neuronale (Fuster-Matanzo *et al.*, 2009). De plus, nous avons vu que la polarité des neurones est permise grâce aux MTs dont la stabilisé peut être régulé par tau. Or, la polarité est indispensable à la croissance axonale (Caceres and Kosik, 1990) et dans les cultures primaires de neurones de souris déficientes en tau, il y a un retard de maturation caractérisée par un retard de croissance axonale et dendritique (Dawson *et al.*, 2001).

Rôle dans la signalisation de l'insuline cérébrale : Une étude récente montre que tau pourrait se lier à PTEN (pour *Phosphatase and TENsin homolog* en anglais) qui est une phosphatase capable de réduire le phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) en phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2). En présence de tau, l'activité de PTEN est diminuée ce qui permet une réponse normale de la signalisation de l'insuline cérébrale *via* PIP3, PDK1 (pour *phosphoinositide-dependent protein kinase-1* en anglais) et Akt (Figure 10). Cependant, en l'absence de tau, PTEN réduit la quantité de PIP3, diminuant la signalisation à l'insuline et favorisant une résistance à l'insuline (Marciniak *et al.*, 2017). De plus, chez les patients atteints de la MA, le taux d'insuline dans le LCR est diminué ainsi que l'activité des récepteurs à l'insuline (Stanley *et al.*, 2016).

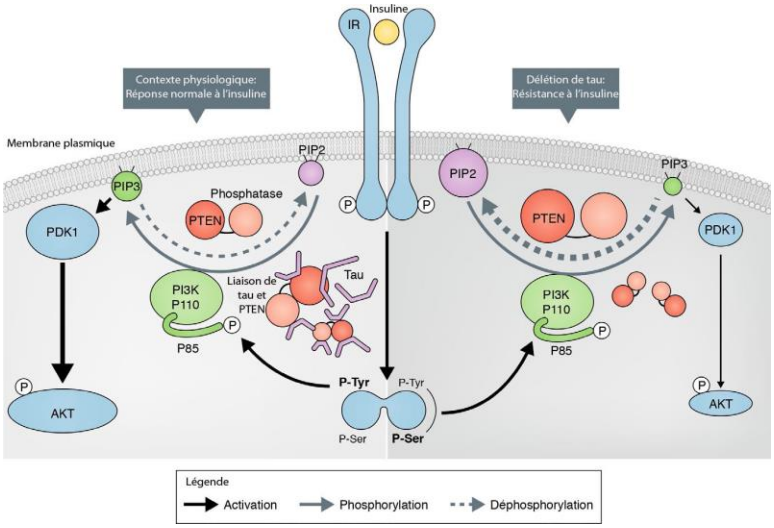

Figure 10 : Schéma du modèle de la régulation de PTEN par tau au sein de la voie de signalisation à l'insuline cérébrale.
Dans le contexte physiologique, la réponse à l'insuline cérébrale est normale tandis que dans le cas d'une délétion de tau, PTEN inhibe la voie de signalisation à l'insuline. Adapté de : (Gratuze and Planel, 2017).

À cause de ses nombreux rôles, il semble évident qu'une modification pathologique de la protéine tau conduisant à une perte de ses fonctions puisse entrainer la mort neuronale pouvant expliquer l'origine des tauopathies dont la MA fait partie.

2.4. Tau dans la MA

2.4.1. Origine des tauopathies

Certaines maladies liées à tau, appelées tauopathies et caractérisées par l'agrégation de tau, sont d'origine infectieuse. Par exemple la panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS), semble être due à une mutation du virus de la rougeole et conduit à une dégénérescence neuronale et une agrégation de tau (Bancher *et al.*, 1996). Cependant, il faut noter que les traumatismes crâniens peuvent aussi induire une agrégation de tau et une perte neuronale conduisant à des démences pugilistiques ou encéphalopathies traumatiques (Tokuda *et al.*, 1991). Contrairement à l'Aβ et aux mutations sur APP et PS, les mutations génétiques sur MAPT ne sont pas à l'origine de la MA. Cependant, il existe environ 60 mutations du gène tau qui peuvent causer d'autres types de tauopathies (Qian and Liu, 2014). La plupart sont associées aux démences fronto-temporales de type parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17), à la maladie de Pick, à la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et à la dégénérescence corticobasale (DCB) (Kovacs, 2017). Dans la DFTP-17, le ratio 3R/4R peut être modifié en faveur de l'une ou de l'autre des isoformes, ce qui va modifier l'affinité de tau pour les MTs et cette affinité peut aussi être diminuée sans modification de l'épissage alternatif. Dans les deux cas, cela mène à l'agrégation de tau. Mais il existe d'autres mécanismes menant à l'agrégation de tau, comme les modifications post-traductionnelles pathologiques (Qian and Liu, 2014).

2.4.2. Modifications post-traductionnelles pathologiques de tau

Il existe deux types de phosphorylations pathologiques : **l'hyperphosphorylation** et la **phosphorylation anormale**. Nous avons déjà vus les sites concernés sur la figure 9. Il s'agit d'hyperphosphorylation quand il y a soit, plus d'épitopes phosphorylés sur une protéine, soit plus de protéines tau phosphorylées sur un épitope, ou les deux. En effet, en conditions normales, la moyenne est de 1,9 à 2,6 groupements phosphate par protéine tandis qu'elle est de 6 à 8 groupements dans les PHFs (Ksiezak-Reding *et al.,* 1992). Concernant la phosphorylation anormale, elle n'est retrouvée qu'en conditions pathologiques dans les NFTs. Des anticorps ont été mis au point comme AP422 (pour l'épitope S422) pour reconnaître les épitopes anormalement phosphorylés (Hasegawa *et al.*, 1996).

Les clivages entraînent des changements de conformation de la protéine tau qui vont augmenter sa capacité d'auto-agrégation. Il est intéressant de noter que le stade de la formation de tau insoluble est corrélé à la mort des animaux qui expriment la protéine tau tronquée transgénique de l'Homme. Dans l'étude de Zilka *et al*, la durée de vie des animaux hétérozygotes est de 10 à 12 mois et celle des homozygotes de 5 à 6 mois sachant que l'espérance de vie des rats de type sauvage dit *wild-type* (WT) est de 22 à 24 mois. Ainsi, l'expression tronquée de tau raccourcirait la durée de vie des hétérozygotes de 50% et des homozygotes de 75%, donc la forme tronquée de tau induit une perte de fonction pouvant être létale (Zilka *et al.*, 2006).

La **glycation** permet la liaison d'un sucre libre sur tau au niveau du MTBD, ce qui diminuerait l'affinité avec les MTs. Nous retrouvons cette modification dans les PHFs de la MA (Ledesma *et al.*, 1995). La **nitration** au niveau de la tyrosine 29 est un événement lié à la MA pouvant influencer le mauvais repliement pathologique et le dépôt de la protéine tau (Reynolds *et al.*, 2006).

2.4.3. Les agrégats

Les agrégats se forment suite aux modifications post-traductionnelles pathologiques telles que la phosphorylation, le clivage, la glycation et la nitration que nous venons de voir. Elles conduisent au détachement des MTs et altèrent leur stabilité, puis tau phosphorylée soluble va s'auto-agréger (Figure 11). Tau va former des dimères puis des oligomères et enfin des protomères avant de s'apparier en hélice pour former des PHFs qui vont s'agréger en NFTs (Martin *et al.,* 2011). Les NFTs vont évoluer de « *pre-tangle* », avec une protéine tau hyperphosphorylée en « *tangle* », avec les agrégats, puis en « *gost-tangle* » lorsque le neurone est mort (Bretteville and Planel, 2008).

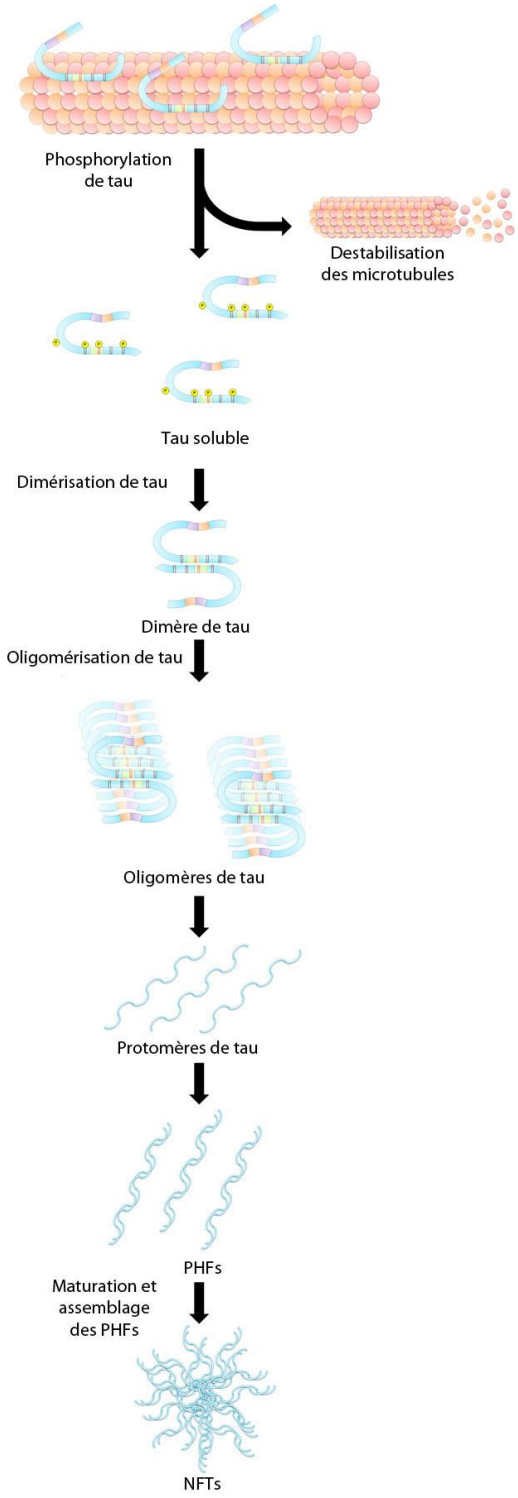

Figure 11 : Schéma des modifications de tau menant à son agrégation.
Adapté de (Martin *et al.*, 2011).

Bien que les NFTs corrèlent avec les déficits cognitifs, des études montrent que les agrégats de tau ne sont pas toxiques et qu'ils pourraient être une forme de protection permettant de capturer les protéines tau pathologiques et les oligomères toxiques (Duff and Planel, 2005; Bretteville and Planel, 2008). En effet, les symptômes de la MA peuvent apparaître avant l'agrégation de tau et une diminution de tau soluble et de Aβ soluble, sans diminuer les NFTs, améliore les capacités cognitives (Oddo *et al.*, 2006). De plus, une étude faite sur des souris transgéniques exprimant une protéine tau pro-agrégeante, a montré que les déficits cognitifs, synaptiques et électrophysiologiques ne sont plus observés suite à l'inhibition du transgène, bien que les agrégats persistent dans le cerveau (Sydow *et al.*, 2011). Cependant, les agrégats peuvent séquestrer les formes physiologiques de tau ce qui leur confère une capacité toxique (Alonso *et al.*, 1996). De plus, comme nous avons vu précédemment, la forme hyperphosphorylée de tau conduit à une perte de ses fonctions, que ce soit dans la stabilisation des MTs, la liaison avec la membrane ou sa fonction nucléaire. En effet, les patients atteints de la MA ont une densité microtubulaire affaiblie par rapport aux sujets sains (Cash *et al.*, 2003).

Néanmoins, la forme hyperphosphorylée de tau est aussi retrouvée au cours du développement ou chez certains animaux lors de l'hibernation ce qui montre qu'elle peut avoir un rôle physiologique (Brion *et al.*, 1994; Arendt *et al.*, 2003).

Il existe différents types d'agrégations de tau qui varient en fonction de leur aspect et de leur localisation. Par exemple, dans la MA, nous retrouvons les **NTFs** ; mais il y a aussi les corps de Pick dans la maladie de Pick, les touffes gliales de la paralysie supranucléaire progressive (PSP), les plaques astrocytaires de la DCB ou encore les "corps en spirale" dans les oligodendrocytes, surtout observés dans la DCB et la PSP (Hasegawa, 2006; Hoglinger *et al.*, 2018). De plus, les agrégats vont être constitués des différentes isoformes de tau avec un niveau de phosphorylation différent. Le profil électrophorétique en SDS-PAGE permet donc de différencier 3 classes possibles. Dans la **première classe**, nous retrouvons les **6 isoformes** avec des bandes allant de 60 à 74 kD (Figure 12). Ces isoformes sont retrouvées dans les agrégats des patients atteints de la MA, de la trisomie 21 (syndrome de Down) ou de la DFTP-17 par exemple. La **classe des isoformes 10** comporte les isoformes 0N4R, 1N4R et 2N4R que nous retrouvons dans la DCB, la PSP mais également la DFTP-17 tandis que **la classe des isoformes sans l'exon 10** comporte les isoformes 0N3R, 1N3R et 2N3R que nous retrouvons dans la maladie de Pick (Buee *et al.*, 2000; Hoglinger *et al.*, 2018).

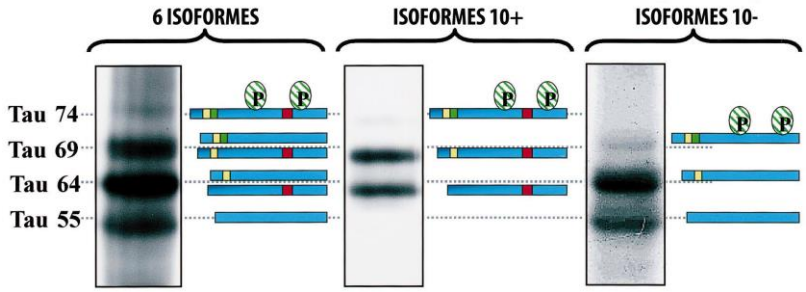

Figure 12 : Image et schéma du profil électrophorétique des Tauopathies.
Adapté de : (Buee *et al.*, 2000).

Ce serait donc un déséquilibre entre les phosphatases et les kinases de tau qui conduirait à une augmentation de la phosphorylation de tau et des NFTs dans la MA (Wang *et al.*, 2007). En effet, une augmentation de l'activité de GSK3β a été observée dans la MA (Leroy *et al.*, 2007) ainsi qu'une diminution de celle de PP2A (Chen *et al.*, 2008). Or GSK3β est impliqué dans la voie de signalisation à l'insuline et pourrait avoir une conséquence dans la MA (Jolivalt *et al.*, 2008). D'ailleurs nous avons vu que le DT2 (avec une résistance à l'insuline) était un facteur de risque pour la MA, de même que l'obésité. Il est difficile de savoir si l'obésité est un facteur de risque à lui seul puisqu'il est souvent accompagné de troubles métaboliques et peut conduire au développement du diabète. De plus nous vu que l'absence de tau pouvait conduire à une résistance de la voie de signalisation de l'insuline cérébrale. C'est pourquoi nous allons voir plus en détail l'insuline et l'obésité ainsi que les connaissances qui les mettent en lien avec la MA.

3. Insuline et obésité

3.1. Insuline

3.1.1. Insuline périphérique

L'insuline est une hormone qui a été découverte en 1921 et est formée de 2 chaînes polypeptidiques, A et B (Figure 13), reliées par deux ponts disulfures (Mayer *et al.*, 2007). L'insuline est **synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas** et fait 51 aa pour un poids moléculaire de 5.8 kDa. Cependant le gène de l'insuline code pour une protéine qui fait 110 aa, qui est le précurseur de l'insuline appelé pré-pro-insuline (Figure 14). Cette protéine contient une séquence signal à l'extrémité N-terminale qui est clivée pour donner la pro-insuline. La pro-insuline est ensuite clivée aux extrémités de la chaîne C pour donner l'insuline qui est stockée dans des granules de sécrétions (Fu *et al.*, 2013).

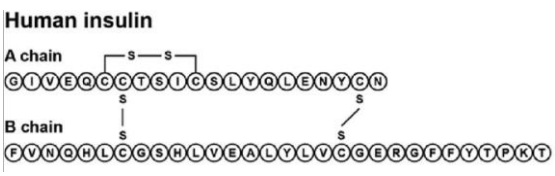

Figure 13 : Schéma de l'insuline.
Source : (Tennagels and Werner, 2013).

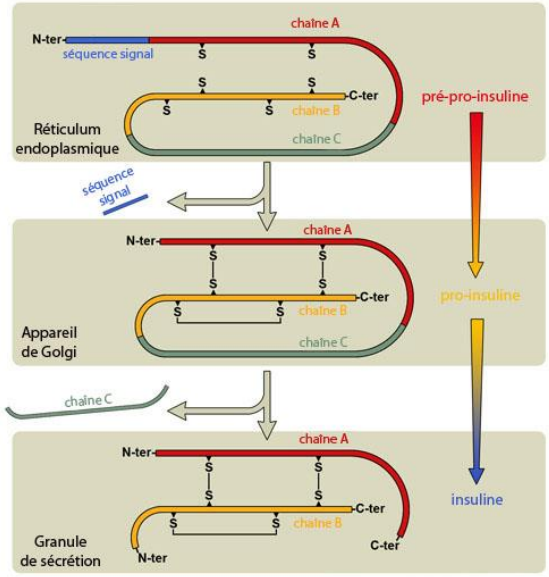

Figure 14 : Schéma du clivage de la pré-pro-insuline donnant l'insuline.
Adapté de Beta Cell Biology Consortium

Le **glucose** permet la stimulation de la **sécrétion de l'insuline** grâce au GLUT 2. Ce transporteur, indépendant de l'insuline, se situe au niveau des cellules β du pancréas et laisse entrer de faibles doses de glucose. Ce glucose intracellulaire pourra alors être phosphorylé par la glucokinase, c'est la première étape de la glycolyse. Cette voie permet d'obtenir du pyruvate qui est oxydé pour obtenir de l'ATP, ce qui va permettre la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP et cela va provoquer une dépolarisation de la membrane plasmique. Des canaux calciques voltages dépendants vont alors s'ouvrir pour laisser entrer des ions calcium, qui vont permettre l'exocytose des granules de sécrétions contenant l'insuline (Fu *et al.*, 2013).

L'insuline qui se retrouve dans le sang va activer les récepteurs à l'insuline au niveau périphérique, qui vont permettre d'activer la **voie de signalisation à l'insuline** et la translocation du GLUT 4 qui est lui, dépendant de l'insuline. Ce transporteur va permettre l'entrée du glucose dans le tissu adipeux ainsi que les muscles cardiaques et squelettiques pour diminuer la glycémie (effet hypoglycémiant) (Saltiel and Pessin, 2002). En effet, l'insuline va stimuler la glycogénogenèse (formation de glycogène) hépatique et inhiber la gluconéogenèse hépatique (formation de glucose) (Barthel and Schmoll, 2003).

3.1.2. Insuline centrale

Des études en 1954 ont montrées que l'insuline ne traverse pas la BHE, mais après 1990, différentes études ont montrées un transport possible mais saturable de l'insuline périphérique vers le cerveau *via* la BHE (Banks *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études montrent la présence, dans le cerveau, d'ARNm du gène de l'insuline 2 (INS2) chez le rat en faible dose et du gène de l'insuline 1 (INS1) chez la souris. Nous retrouvons également le gène de l'insuline chez les lapins dans les neurones de l'hippocampe et le bulbe olfactif. INS2 est le gène qui se rapproche le plus de celui de l'humain. Le gène de l'insuline humain est également retrouvé dans plusieurs régions du cerveau (Gray *et al.*, 2014). Il serait donc possible d'avoir non seulement un transport *via* la BHE mais aussi une synthèse locale de l'insuline au niveau central.

Contrairement à la périphérie, dans le SNC, l'insuline semble ne pas avoir de rôle sur le transport du glucose (dans la plupart des cellules du cerveaux ou pour la BHE) puisque les transporteurs impliqués, GLUT 1 et GLUT 3, ne dépendent pas de l'insuline (Gray *et al.*, 2014). Son rôle serait de diminuer la prise alimentaire et le poids (rôle **anorexigène**) puisqu'ils diminuent après une injection d'insuline dans le cerveau des primates (Woods *et al.*, 1979) et des rats (Ikeda *et al.*, 1986). De plus, l'invalidation du récepteur à l'insuline (IR pour *insulin receptor* en anglais) dans les neurones conduit à une augmentation de la prise alimentaire et du poids (Bruning *et al.*, 2000). Dans l'étude de Bruning *et al.*, nous pouvons également voir le rôle de l'insuline dans la **reproduction** et dans la **régulation du métabolisme du glucose périphérique**. En effet, une délétion des récepteurs à l'insuline au niveau centrale peut mener à une résistance à l'insuline en périphérie (Obici *et al.*, 2002). L'insuline aurait également un rôle dans la **mémoire** puisque son injection intra-nasale augmente la mémoire de travail, sans modifier la glycémie périphérique (Benedict *et al.*, 2007).

Comme au niveau périphérique, l'insuline centrale circulante va se fixer sur ses récepteurs et activer la voie de signalisation à l'insuline. Les récepteurs à l'insuline sont largement distribués, mais une

étude montre une plus grande concentration dans l'hypothalamus, le cortex et le cervelet (Hopkins and Williams, 1997). La voie de signalisation à l'insuline se compose de deux voies principales que sont la voie MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase* en anglais) et la voie PI3K/Akt (Figure 15). L'insuline va se lier au IR qui est constitué de deux sous-unités α et de deux sous-unités β formant un hétérotétramère. Lors de la liaison de l'insuline aux sous-unités α extracellulaires, le récepteur subit un changement de conformation, permettant l'activité de la tyrosine kinase des sous-unités β, entraînant l'autophosphorylation du récepteur et, par la suite, la phosphorylation des protéines du substrat du récepteur à l'insuline (IRS pour *insulin receptor substrat* en anglais). PI3K, Grb2 (pour *growth factor receptor binding protein* en anglais) et Syp (pour *protein tyrosin phosphatase* en anglais) vont alors pouvoir se lier à IRS1. La liaison de ces protéines a pour résultat leur activation, déclenchant des signaux en aval tels que l'activation de la cascade MAPK ou l'activation de sérine/thréonine kinases en aval de PIP3. Ces signaux entraînent finalement divers réponse, tels que l'inhibition de l'apoptose, la phosphorylation de tau, et la régulation de la transcription des gènes (Plum *et al.*, 2005).

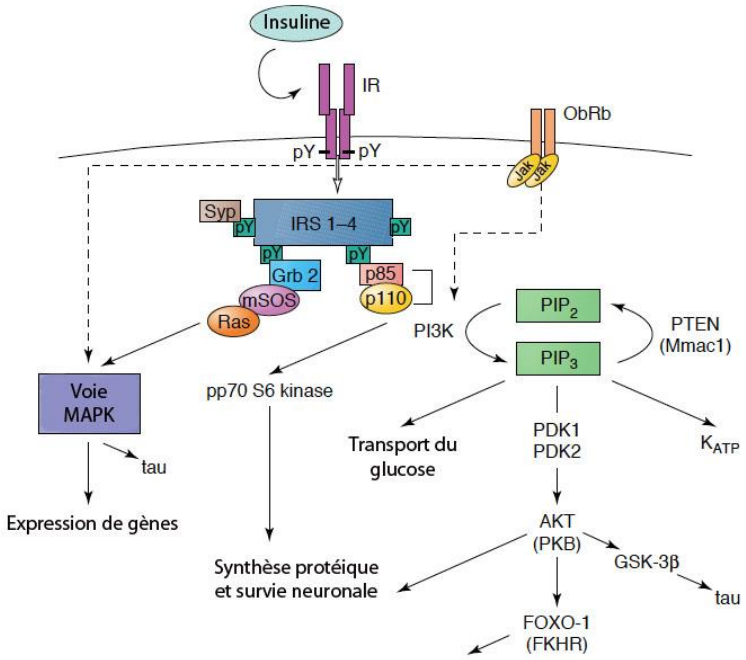

Figure 15 : Schéma de la voie de signalisation de l'insuline dans le cerveau.
L'activation du récepteur à l'insuline permet d'activer le substrat du récepteur à l'insuline qui va permettre aux deux voies principales d'enclencher la cascade signalétique. Adapté de : (Plum *et al.*, 2005).

3.1.3. Le diabète

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie et existe sous deux formes : La diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2). Le DT1 est dû à une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas qui produisent l'insuline. Même lors d'une augmentation du glucose sanguin, les cellules β ne seront plus capables de sécréter de l'insuline, donc les cellules qui contiennent des GLUT 4 ne recevront pas le signal leur permettant la translocation du transporteur. Le glucose ne pourra donc pas être utilisé et nous aurons une hyperglycémie accompagnée d'une hypoglycémie. Des injections d'insuline permettent de contrôler le taux de glycémie dans le sang.

Dans le DT2, l'insuline est sécrétée normalement mais les cellules sont incapables de répondre (Figure 15). Il s'agit d'une résistance à l'insuline qui est due à une diminution ou un arrêt de l'activité des récepteurs à l'insuline ou des autres composants de sa voie de signalisation. Dans ce cas, nous aurons une hyperglycémie accompagnée d'une hyperinsulinémie car les cellules β des îlots de Langerhans vont sécréter plus d'insuline pour réguler l'hyperglycémie (Festa *et al.*, 2006).

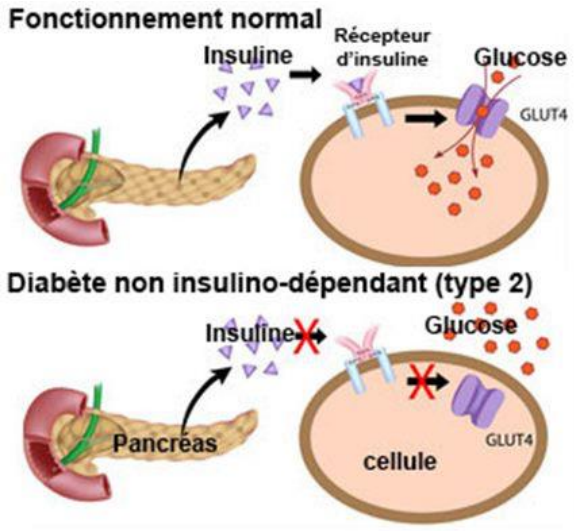

Figure 16 : Effet de l'insuline en condition normale et lors d'un diabète de type 2.
En condition normale, l'insuline sécrétée permet d'activer la voie de signalisation à l'insuline et permet l'entrée du glucose dans les cellules *via* GLUT 4. Dans le cas du DT2, l'insuline n'a pas d'effet sur le récepteur ou la voie de signalisation n'est pas active, ce qui empêche la translocation du GLUT 4 et l'entrée du glucose dans les cellules. Source : (www.docteurclic.com).

Il existe de nombreux facteurs de risque pour le DT2 dont les principaux sont les facteurs génétiques, l'âge et l'obésité (Hu, 2011) or nous avons vu que le DT2 est un facteur de risque pour la MA (Biessels *et al.*, 2005) de même que l'obésité (Beydoun *et al.*, 2008). Étant donné que l'obésité est un facteur de risque pour le DT2 et la MA, il est important de déterminer s'il est un facteur de risque indépendant du DT2 et de la résistance à l'insuline pour la MA.

3.2. Obésité

D'après l'OMS, le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé. L' indice de masse corporelle (IMC) est un moyen simple de mesurer l'obésité dans la population : il correspond au poids de la personne (en kilogrammes) divisé par le carré de sa taille (en mètres). Les personnes sont considérées en surpoids lorsque leur IMC est supérieur à 25, et elles sont considérées comme obèses lorsque l'IMC est supérieur à 30.

En 2016, dans le monde, plus de 1,9 milliard d'adultes de 18 ans et plus étaient en surpoids. Parmi eux, plus de **650 millions** étaient obèses. Ces chiffres alarmants représentent respectivement 39 et 13% de la population adulte et montrent l'importance de prévenir l'obésité, puisqu'elle est un facteur de risque pour de nombreuses maladies comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles musculo-squelettiques comme l'arthrose et certains cancers (Kyrou *et al.,* 2000) mais aussi pour la MA, surtout si elle est développée en milieu de vie (Beydoun *et al.*, 2008; Polydoro *et al.*, 2009; Anstey *et al.*, 2011). De plus, l'obésité, une alimentation riche en gras et le manque d'activité physique sont également des facteurs de risque pour le DT2 (Hu, 2011) qui est justement un facteur de risque pour la MA (Baglietto-Vargas *et al.*, 2016). L'augmentation du nombre de personnes obèses vient principalement de la sédentarisation et des travaux de moins en moins manuels ainsi que de l'alimentation de plus en plus accessible et riche en calories (French *et al.*, 2001).

3.2.1. Obésité, insuline et MA

En plus d'une diminution des niveaux des transporteurs de glucose chez les patients atteints de la MA (vu précédemment 1.5.4.), une diminution du taux d'insuline dans le LCR et du nombre de récepteurs à l'insuline dans le cerveau est également observée. Cette résistance à l'insuline centrale se fait de manière indépendante aux DT1 et 2 et c'est pourquoi certains chercheurs parlent de la MA comme étant un diabète de type 3 (Steen *et al.*, 2005). Dans l'étude de Craft *et al,* en plus d'une diminution du taux d'insuline dans le LCR, une augmentation de l'insulinémie périphérique est observée chez les patients atteints de la MA (Craft *et al.*, 1998). De nombreuses études soutiennent cette corrélation entre les changements de l'insuline périphérique et la MA (Ma *et al.*, 2016). Cependant, certaines études n'observent pas ces changements. Il est donc difficile de dire si les modifications au niveau de l'insuline centrale et de ses récepteurs sont une cause ou une conséquence de la MA (Stanley *et al.*, 2016).

Si nous retrouvons des troubles du métabolisme tel que la résistance à l'insuline chez les patients atteints de la MA, nous pouvons également retrouver les symptômes et les affections neuropathologiques semblable à la MA chez des personnes atteintes d'obésités. Par exemple, une **atrophie cérébrale** de l'hippocampe est observée chez les personnes obèses ainsi qu'un **déclin cognitif** et une altération de la mémoire (Jagust *et al.*, 2005; Sellbom and Gunstad, 2012). Une **augmentation de tau, Aβ et APP** est également observée chez des patients atteints d'obésité morbide (avec un IMC compris entre 45 et 81) âgés de moins de 65 ans (Mrak, 2009).

Toutes ces corrélations entre l'obésité, l'insuline et la MA ont poussé les chercheurs à étudier l'impact de l'obésité sur les marqueurs pathologiques de la MA dans des modèles murins transgéniques ou WT.

3.2.2. Modèles d'obésités

L'impact de l'obésité sur la MA est de plus en plus étudié mais il est difficile d'obtenir des souris obèses sans qu'elles ne développent également un diabète. Par exemple les souris db/db (diabétiques) avec une mutation sur le récepteur de la leptine, ou les souris ob/ob (obèses) avec une mutation sur le gène codant pour la leptine, sont des souris qui vont développer une obésité mais également un DT2. Il est donc impossible de dire si l'augmentation de la phosphorylation de tau observée chez ces souris est due à la résistance à l'insuline périphérique ou à la prise de poids (Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013). De plus, il semblerait que dans ces modèles, ce soit l'hypothermie, suite au diabète et à la diminution du métabolisme du glucose, qui serait à l'origine de l'hyperphosphorylation de tau (El Khoury *et al.*, 2016; Gratuze *et al.*, 2017). De nombreuses études utilisent un régime riche en gras pour induire une obésité mais les résultats sont très différents (El Khoury *et al.*, 2014). Là encore, une résistance à l'insuline peut se développer et les résultats sont difficilement attribuables à l'obésité.

Il est intéressant de noter les nombreuses variations entre les études et les limites de chacune (Tableau 1):

- **Le sexe** : certains articles étudient les mâles ou les femelles seulement, d'autres étudient les deux ensembles ou séparément mais parfois le sexe n'est pas spécifié.
- **La durée et l'âge de début de la diète** : la diète commence entre 1 et 6 mois et dure de 4 à 13 mois.
- **La composition** : si une diète riche en gras à 60% de kilocalories (Kcal) de gras est généralement utilisée, la source du gras, les rapports en gras insaturés et saturés, les

pourcentages protéiques ne sont pas toujours précisés et varient beaucoup d'une étude à l'autre.

- **Mesures** : Le poids n'est pas toujours précisé dans les études tout comme l'insulinémie et la glycémie.
- **Le modèle** : certaines études ont utilisé des souris WT, d'autres des souris 3xTg-AD, THY-Tau22, P301S, hTau, $APP^{NL/NL}$ ou encore APdE9 (ou APP/PS1).

Le modèle 3xTg-AD exprime 3 mutations, $PS1_{M146V}$, APP_{Swe} (*Swe* pour *Swedish* en anglais) et Tau_{P301L} sur les gènes PS1, APP et MAPT respectivement (Oddo *et al.*, 2003). Le modèle THY-Tau22 est généré par la surexpression de la protéine tau humaine 4R avec deux mutations sur MAPT (G272 V et P301S) (Schindowski *et al.*, 2006). La mutation P301S diminue l'affinité de tau pour les MTs sans toucher à l'épissage alternatif de tau et augmente les risques d'agrégation (Yoshiyama *et al.*, 2007). Le modèle hTau est un modèle qui exprime la protéine tau humaine non mutée, comme dans la MA (Andorfer *et al.*, 2003; Andorfer *et al.*, 2005). Il est obtenu par croisement d'une souris 8c qui exprime un transgène de tau humain (Duff *et al.*, 2000) avec une souris invalidé pour le gène de tau (TKO pour *tau knockout* en anglais) qui a une altération ciblée de l'exon 1 de la tau murine (Tucker *et al.*, 2001). Le modèle $APP^{NL/NL}$ porte des mutations *Swe* et *Beyreuther/iberian* du gène APP (Saito *et al.*, 2014) et le modèle APdE9 ou APP_{Swe}/PS1dE9 exprime 2 mutations : APP_{Swe} et PS1dE9 (l'exon 9 (délété) du gène humain de PS1) (Borchelt *et al.*, 1997; Jankowsky *et al.*, 2004).

Il est donc difficile de tirer des conclusions sur les études faites jusqu'à présent (Table 1). Dans l'étude de Jeon *et al.*, une **augmentation de la phosphorylation** de tau chez des **mâles WT**, peut être due à une augmentation de l'activation de GSK3β et une diminution de la phosphorylation du IR, est observée. De plus une augmentation de leur masse corporelle, de **l'insulinémie** et de **l'intolérance au glucose** est également observée (Jeon *et al.*, 2012). Nous observons le même phénomène dans deux autres études, sauf qu'à défaut d'avoir regardé la sérine S9 de GSK3β, ils observent une augmentation de la phosphorylation de JNK, une autre kinase de tau (Petrov *et al.*, 2015; Kothari *et al.*, 2017).

Chez les mâles **THY-Tau22** (Leboucher *et al.*, 2013), les femelles **P301S** (Koga *et al.*, 2014) et les souris **WT** (Bhat and Thirumangalakudi, 2013; Kim *et al.*, 2015), une **augmentation de la phosphorylation** de tau est observée **sans augmentation de l'insulinémie** avec seulement une **intolérance au glucose**. Chez des souris **3xTg-AD**, une phosphorylation anormale de tau est observée mais comme **l'insulinémie, la glycémie et le poids ne sont pas précisés**, nous ne savons pas si ces

facteurs jouent sur l'augmentation de la phosphorylation de JNK et IRS-1, également observée dans cette étude (Ma *et al.*, 2009).

Table 1 : Comparaison d'études sur l'impact d'un régime riche en gras sur la pathologie tau dans différents modèles de souris.

1er Auteur	modèle	sexe	début diète	durée diète	HFD	poids	I	G	ITT	GTT	tau	autre
Jeon	mâles	WT	1 mois	5 mois	60% kcal	↗	↗	?	↗	↗	ptau ↗	pIR, pAMPK et pGSK3β (S9) ↘
Becker	mâles	WT	1 mois	3 mois	15% fat	↗	↗	?	✖	✖	AT8, AT180, AT270, pS199, pS396 ✖	pAkt, pGSK3β (S9), pERk1/2, pJNK, pIR ✖
Kothari	mâles	WT	3.5 mois	3.5 mois	40% kcal + sucre	↗	↗	✖	H↗	↗	pTau ↗	pIRS-1, pAkt, pJNK, pAMPK (S485) ↗ pIR, pGSKβ (S21), GLUT1, GLUT3 ↘
												Anesthésie CO2
Ramos-R	souris	WT	2 mois	4,5 mois	60% kcal	↗	↗	↗	?	?	✖	mémoire ✖
Kim	souris	WT	1 mois	6 mois	54% kcal	↗	?	✖	?	↗	pS199/202 et pS396 ↗	pAMPK sur pS485, pIRS sur pS612 et pS636/639, pAkt, pERK ↗
Bhat	souris	WT	4 mois	2 mois	21% fat	?	✖	?	?	↗	(PHF1 et pT231) ↗	Anesthésie (ip) / pIRS et pAkt ↘
Julien	souris	3xTg-AD	4 mois	13 mois	60% kcal 35% fat	↗	?	?	?	?	✖	forme insoluble et soluble de tau ↗
		Non-Tg									?	Anesthésie (ketamine/xylazine)
Knight	mâles	3xTg-AD	2 mois	13-14 mois	60% kcal	↗	?	?	?	?	✖	mémoire Y-maze ↘
		WT										
Ma	souris	3xTg-AD	5 mois	4 mois	21% fat	?	?	?	?	?	pS422 ↗	pJNK, pIRS-1 sur S616 ↗
Barron	mâles	3xTg-AD	3 mois	4 mois	60% kcal	↗	↗	↗	H ↗	↗	AT8 ✖	testostérone ↘
	femelles						✖	✖	✖	✖		estradiol ✖
Takalo	2 sexes séparés	APdE9	5 mois	4 mois	21% fat	?	✖	✖	✖	✖	AT8 chez femelles ↗	4R chez les femelles ↗
		WT				?	?	?	?	?		
Walker	2 sexes séparés	WT	2 mois	10 mois	60% kcal	↗	✖	↗	✖	↗	pS396 ✖	pS396 APP/PS1 HFD>pS396 WT HFD
		APP/PS1										Anesthésie (isoflurane)
Petrov	mâles	WT	1 mois	5 mois	45 kcal% 25% fat	↗	↗	✖	↗	↗	pS404 ↗	pAkt↘ pJNK, p35, pCDK5, pIRS-1 ↗
		APP/PS1						↗			✖	pAkt ↘ , pJNK et pCDK5 ↗
Salas	mâles	AppNL/NL	2 mois	18 mois	60% kcal	↗	↗	↗	↗	↗	AT180 et AT270 ✖	LTP ↘
Koga	femelles	P301S	1,5 mois	10 mois	15% fat	↗	✖	✖	✖	↗	IHC AT8 et soluble tau + AT8 ↗	p38 et Cdk5 ↗
Leboucher	mâles	THY-Tau22	2 mois	5 mois	59% kcal	↗	↗	↗	✖	↗	pSer214, pSer404, pSer422 et IHC AT8↗	pGSK3β(S9), pAkt, pCaMKII ↗
		WT							↗		pTau ✖	✖
Gratuze	2 sexes	hTau	2 mois	6 mois	45% kcal	↗	✖	✖	✖	✖	✖	✖

I : Insuline; G : Glucose; ip : injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium; H : test HOMA-IR (pour Homeostasis model assessment of insulin resistance en anglais) ; ↘ Diminution de la phosphorylation de tau; ↗ Augmentation de la phosphorylation de tau; ✖ : Pas de modification significative; ?: Renseignements absents. Les régimes sont exprimés en pourcentage de gras (fat) ou en pourcentage de kcal de gras (kcal).

Dans d'autres études, **aucune augmentation de la phosphorylation** de tau n'est observée chez des souris **WT**, **malgré une insulinémie** et/ou une **glycémie** qui augmentent (Becker *et al.*, 2012; Leboucher *et al.*, 2013; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013). Cette absence de modification de la phosphorylation de tau est retrouvée chez des mâles **3xTg-AD** (Barron *et al.*, 2013), App$^{NL/NL}$ (Salas *et al.*, 2018) et APP/PS1 (Petrov *et al.*, 2015), malgré qu'ils développent un **résistance à l'insuline** et une **intolérance au glucose**. L'absence d'hyperphosphorylation de tau est aussi observée chez des souris **WT** et **APP/PS1** des deux sexes qui sont **intolérantes au glucose** (Walker *et al.*, 2017), chez

les souris **hTau**, qui ne sont **ni résistantes à l'insuline**, **ni intolérantes au glucose** (Gratuze *et al.*, 2016) mais aussi chez des souris **3xTg-AD** dont **l'insulinémie et la glycémie ne sont pas précisées** (Julien *et al.*, 2010). Cependant, dans l'étude de Julien *et al*, une augmentation de la forme totale soluble et insoluble de tau est observée. De plus, une **diminution de la mémoire** est observée chez les souris WT et 3xTg-AD mâles malgré qu'il n'y ait **pas de modifications significatives de la phosphorylation** de tau (Knight *et al.*, 2014) et une diminution de la LTP peut également être observée (Salas *et al.*, 2018).

Enfin, certaines études montrent une **différence** de résultats entre les **sexes** lorsqu'ils sont étudiés séparément, avec une diminution de la mémoire chez les mâles 3xTg-AD (Barron *et al.*, 2013) et une augmentation de l'expression de l'isoforme 4R de tau chez les femelles dans le modèle Alzheimer APdE9 (Takalo *et al.*, 2014).

Il est important de noter que différentes études ont effectué une anesthésie avant le sacrifice (Tableau 1). Or, Planel *et al.*, ont montré que l'anesthésie induit une chute de température chez la souris qui est responsable d'une forte augmentation de la phosphorylation de tau (Planel *et al.*, 2007). Ainsi, l'hyperphosphorylation observée dans les études qui ont effectué une anesthésie pourrait être due à l'hypothermie et non au régime riche en gras.

Toutes ces études aux résultats controversés nous ont poussé à étudier l'impact de l'obésité dans la MA de manière rigoureuse, en séparant les sexes, en étudiant des souris WT en plus du modèle hTau et en contrôlant les paramètres glycémiques et insulinémiques périphériques, le poids ainsi que la température. De plus, nous avons étudié la voie de signalisation à l'insuline centrale afin d'élucider les possibles mécanismes impliqués.

Chapitre 1 : Étude d’un régime riche en gras sur des souris sauvages et hTau, un modèle de la maladie d’Alzheimer

Impact of a high-fat diet on insulin resistance and tau phosphorylation in WT and hTau mice.

Ophélie Lerdu[1,2], Maud Gratuze[1,2], Françoise Morin[2], Emmanuel Planel[1,2].

[1]Université Laval, Faculté de Médecine, Département de Psychiatrie et Neurosciences, Québec, QC, Canada;

[2]Centre de recherché du Centre Hospitalier de l'Université Laval de Québec, Axe Neurosciences, Québec, QC, Canada;

1. Résumé

Il existe de nombreux facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer. Cependant, les études montrent beaucoup de variabilités au niveau des résultats concernant l'impact d'un régime riche en gras sur la protéine tau, un marqueur de la maladie d'Alzheimer. En effet, cette maladie est caractérisée par l'atrophie cérébrale, les plaques amyloïdes, l'hyperphosphorylation de la protéine tau et son agrégation.

Notre étude consiste à analyser l'impact d'un régime riche en gras de 6 mois, à 60% de Kcal de gras, chez des souris sauvages et hTau qui expriment la protéine tau humaine. Les souris mâles et femelles ont été séparées dans cette étude pour montrer la différence entre les sexes et l'importance de les étudier séparément. Dans le cortex et l'hippocampe, deux régions fortement atteintes dans la maladie d'Alzheimer, nous avons étudié: la phosphorylation et l'agrégation de tau, la voie de signalisation à l'insuline centrale, les kinases et les phosphatases de tau. De plus, nous avons mesuré le niveau d'insuline et de glucose périphérique.

Dans notre étude, le statut de résistance à l'insuline en périphérie semble être un facteur de risque pour la phosphorylation de tau. En effet, seulement le groupe sauvage mâle qui était résistant à l'insuline a montré une hyperphosphorylation de tau et une diminution de la phosphorylation de Akt et de S9 (la sérine de GSK3β), deux kinases impliquées dans la voie de signalisation à l'insuline cérébrale mais aussi dans la phosphorylation de tau. Nous avons aussi observé une diminution de PP2AC dans l'hippocampe des mâles sauvages. Concernant les femelles sauvages, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de tau et une augmentation de l'expression PP2AC dans leur cortex. Néanmoins, aucun changement significatif n'était visible chez les souris hTau, ni pour la phosphorylation de tau et son agrégation, ni pour les kinases et les phosphatases.

Les souris hTau semblent résister à l'impact d'un régime riche en gras, contrairement aux souris sauvages. L'obésité, sans résistance à l'insuline, ne semble pas suffisante pour induire la phosphorylation de la protéine tau chez les souris hTau et le mécanisme chez les souris sauvages reste peu clair.

2. Abstract

There are many proven risk factors for Alzheimer's disease, such as age and obesity. However, studies show significant variability in the impact of high-fat diets on tau protein, a marker of the disease. Indeed, this disease is characterized by cerebral atrophy, plaques amyloid, the hyperphosphorylation of tau protein and its aggregation.

Our study analyzes the impact of a 6-month high-fat diet at 60% Kcal from fat on wild-type and hTau mice expressing the human tau protein. The males and females mice were separated to show the difference between sexes and the importance of studying them separately. In the cortex and hippocampus, the two regions most heavily affected by Alzheimer's disease, we studied: tau phosphorylation and aggregation, central insulin pathways, tau kinases and phosphatases. In addition, we measured peripheral insulin and glucose levels.

In our study, the periphery insulin resistant status was a risk factor for tau phosphorylation. Indeed, only the insulin-resistant wild-type males showed tau hyperphosphorylation and a decrease in Akt and S9 (GSK3- β's serine) phosphorylation: the two kinases involved in cerebral insulin pathways as well as tau phosphorylation. The PP2AC expression also decreased in the hippocampus of wild-type males. Only a small decrease in tau phosphorylation was observed in wild-type females, with an increase in PP2AC in the cortex after the HFD. No significant change was observed in hTau mice, neither in the phosphorylation of tau and its aggregation nor in the kinases and phosphatases.

hTau mice appear to be resistant to the impact of a high-fat diet, unlike wild-type mice. Obesity without insulin resistance did not induce tau phosphorylation in hTau mice and the mechanism in wild-type mice remains uncertain.

3. Introduction

In 2018, 50 million people worldwide had dementia and it is projected that 131 million will be affected in 2050 (World Alzheimer Report 2018). According to WHO (World Health Organization), 60 to 70% of dementias are due to Alzheimer's disease (AD) (Ferri *et al.*, 2005). There are two forms of AD: a hereditary and early familial form, which accounts for 1% of cases and is caused by complete penetrance (Harvey *et al.*, 2003), and a sporadic late form which accounts for 99% of cases and is caused by different genetic and environmental factors (Hebert *et al.*, 2013). The main hallmarks of AD are cerebral atrophy (Fox *et al.*, 1996), neuritic plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). The two latter affections are *post-mortem* markers that are used in diagnosing AD (LaFerla and Oddo, 2005). The NFTs are mainly formed of abnormally phosphorylated or hyperphosphorylated tau protein (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). In addition, the increase in the number of NFTs correlates with cognitive decline (Duff and Planel, 2005; Bretteville and Planel, 2008).

One of the mechanisms explaining this phosphorylation is an imbalance between the kinases that phosphorylate tau and the phosphatases that dephosphorylate them (Wang *et al.*, 2007). Overactivation of Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3-β) has been observed in AD (Leroy *et al.*, 2007) as well as a decrease in the expression of protein phosphatase 2 (PP2A) (Chen *et al.*, 2008; Iqbal *et al.*, 2009). Furthermore, GSK3-β can be modulated by the insulin-signaling pathway (Jolivalt *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2011). Research supports that metabolic syndromes (Pasinetti and Eberstein, 2008; Frisardi *et al.*, 2010) as well as mid-life obesity (Kivipelto *et al.*, 2005) increase the risk of developing AD. Moreover, obesity is a risk factor for type 2 diabetes (DT2) (Hu, 2011) and DT2 is a risk factor for AD (Baglietto-Vargas *et al.*, 2016). As such, it is essential to study the impact of obesity and metabolic syndromes, such as insulin resistance, on the Alzheimer-like tau pathology.

Studies have shown that obese mouse models such as ob/ob or db/db exhibit hyperphosphorylation due to activation of tau kinases GSK3-β or c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Kim *et al.*, 2009; Shuai *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). However, these models also develop type 2 diabetes and do not study the impact of obesity *per se*. Moreover, these models developed hypothermia, which could have caused tau hyperphosphorylation (El Khoury *et al.*, 2016; Gratuze *et al.*, 2017). Other studies have analysed the impact of a high-fat diet (HFD) and the results vary greatly from one study to another (Khoury *et al.*, 2018). This may be due to differences in sexes, age, the model used and the duration and composition of diets, among possible factors. Some studies showed increased tau phosphorylation in WT males due to increased JNK activation and decreased phosphorylation of IR along with an increase of body mass, insulin resistance and glucose intolerance (Petrov et al., 2015;

Kothari et al., 2017). In THY-Tau22 males (Leboucher et al., 2013), P301S females (Koga et al., 2014) and WT mice (Bhat and Thirumangalakudi, 2013, Kim et al., 2015), increased tau phosphorylation was observed with glucose intolerance but not with increased levels of insulinemia. A lack of modification of tau phosphorylation is found in 3xTg-AD (Barron et al., 2013), $App^{NL/NL}$ (Salas et al., 2018) and APP/PS1 (Petrov et al., 2015) males, despite developing insulin resistance and glucose intolerance. The absence of tau hyperphosphorylation was also observed in glucose intolerant WT and APP/PS1 mice of both sexes (Walker et al., 2017). Finally, the findings vary in studies that investigated sexes separately. There was a decrease in memory in 3xTG-AD males (Barron et al., 2013) and an increase in tau 4R isoform in female APdE9 (Takalo et al., 2014). Notably, the temperature was not reported while it plays an important role on tau physiology (Planel *et al.*, 2004).

Rigorous research on the impact of such a diet in mice expressing the human tau protein (hTau) (Andorfer *et al.*, 2003) has shown no effect on tau phosphorylation, neither in insulin resistance nor in glucose intolerance (Gratuze *et al.*, 2016). A diet of 45% Kcal from fat may not have induced tau phosphorylation because the basal metabolic rate per gram of body weight is seven times higher in mice than in humans (Demetrius, 2005). Moreover, in the Gratuze *et al.* study, male and female hTau mice were studied together. Thus, we decided to complete the same study but with 60% Kcal from fat while separating males and females and adding WT mice. The mice in the previous study were obese but did not develop insulin resistance or glucose intolerance. With a fattier diet, we expect the development of insulin resistance and increased tau phosphorylation. This would demonstrate that obesity accompanied by a metabolic disorder is a risk factor for developing AD.

The purpose of this study was to determine whether a HFD would promote tau pathology in AD-like model, whether these risks were independent of metabolic disorders, and the importance of separating males and females. We also sought to determine the mechanisms leading to changes in tau phosphorylation. In addition, we studied the main tau kinase GSK3-β, phosphatase PP2A, and the major components of the central insulin signalling pathway, like the insulin receptor (IR), Phosphoinositide 3-kinases (PI3K), and Akt (also known as Protein kinase B) (Plum *et al.*, 2005). Since hTau mice started to develop tau pathology at 9 months (Polydoro *et al.*, 2009) we killed the mice at the age of 8 months to see if the HFD would accelerate the development of pathology. We saw effects of the HFD on tau phosphorylation in wild-type mice only. Our results suggest that obesity overall does not exacerbate tau pathology in the hTau model, with the exception of male WT if accompanied by insulin resistance.

4. Methods

4.1. Animals.

Mice models. The hTau mice were generated by crossing 8c with tau knockout mice (Andorfer *et al.*, 2003; Andorfer *et al.*, 2005). 8c mice expressed a tau transgene derived from a human PAC containing the coding sequence, intronic regions, and regulatory regions of the human gene (Duff *et al.*, 2000), while tau knockout mice have a targeted disruption of exon one of tau (Tucker *et al.*, 2001). Wild-type and hTau mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) (B6.Cg-Mapttm1(EGFP)Klt Tg(MAPT)8cPdav/J) on C57BL/6J background. Mice of both sexes were maintained in a temperature-controlled room (~23°C) with a light/dark cycle of 12/12 hours and experiments were performed during the light period. We had 20 mice of each sex for the WT, 22 hTau males and 19 hTau females.

Mice diets. All animals had access *ad libitum* to water and to pelleted food from Harlan Teklad (Madison, WI, USA) (see Table for exact diet composition in Annexe.1). The mice were divided into two diet groups at the age of two months for duration of six months: a standard purified diet control (CTL; TD.97184; WT: n=10, hTau: n=11) and a high-fat diet (HFD; 60% kcal from fat; source: lard; TD.06414; WT: n=10, hTau M: n=11; hTau F: n=8). The animals were handled according to procedures approved by the Comité de Protection des Animaux du CHU under the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Assessment of metabolic changes. Glucose Tolerance Test (GTT) was performed by fasting the mice for 6 hours (0'), and then injecting them intraperitoneally with 10% dextrose (0.1 ml/10g). For Insulin Tolerance Test (ITT), fasted mice were injected intraperitoneally with 1 U/kg of insulin (Humulin R; Elli Lilly & Co., Indianapolis, IN, USA). Blood samples were collected and glucose levels were measured at different time points (0', 15', 30', 60' and 90 minutes) as mentioned above. Before the mice were killed, they were weighed, the body temperature was monitored using a rectal probe (Thermalert TH-5, Physitemp, Clifton, NJ, USA), and the fasting blood glucose was measured using a glucometer with reagent strips (ACCU-CHEK ® Aviva Nano; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Fasting plasma insulin was determined using a sandwich enzyme immunoassay according to the manufacturer instructions (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Mercodia, Sweden).

4.2. Protein extraction.

Mice were killed by decapitation without anesthesia to avoid hypothermia-induced tau hyperphosphorylation (Planel *et al.*, 2007). The brains were immediately removed and the tissues were dissected on ice, frozen on dry ice, and then kept at -80°C until they were processed as described by Julien (Julien *et al.*, 2012). Specifically, dissected brain structures (hippocampus, cortex) were homogenized without thawing in 5 times volume/weight of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µl/ml of Proteases Inhibitors Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)), using a mechanical homogenizer (TH, Omni International, Marietta, GA). Samples were then centrifuged for 20 min at 20,000 G at 4°C. The supernatant was recovered, diluted in sample buffer (NuPAGE LDS; Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 5% of 2-β-mercapto-ethanol, 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µl/ml of Proteases Inhibitors Cocktail (P8340; Sigma-Aldrich), boiled for 10 min at 95°C (Thermomix incubator), and maintained then at -20°C.

4.3. Purification of aggregates.

Tau aggregates were extracted according to the protocol previously used in mouse models of tauopathies (Julien *et al.*, 2012), with the additional use of 1% sarkosyl, as derived from a separate tau aggregation protocol for Alzheimer's disease (AD) patients (Greenberg and Davies, 1990). Specifically, the RIPA supernatant was adjusted to 1% sarkosyl (N-lauroylsarcosine), incubated for 30 minutes at room temperature with constant shaking and centrifuged at 100,000x G for 1 hour at 20°C. The pellet containing sarkosyl-insoluble aggregated (SP fraction) was resuspended and diluted in sample buffer (NuPAGE LDS) containing 5% of 2-β-mercapto-ethanol, 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µl/ml of Proteases Inhibitors Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), boiled for 5 min, and maintained at -20°C.

4.4. Western blotting.

SDS-PAGE and Western blot analyses were performed as described by Petry (Petry *et al.*, 2014). All antibodies used in this study are listed in Annexe.2. All were purchased except for PHF-1 (Otvos *et al.*, 1994), CP13 (Weaver *et al.*, 2000) and CP27 (Duff *et al.*, 2000), which were a generous gift from Dr. Peter Davies. Depending on the antibody used, 10–20 µg of brain protein were analyzed. The brain homogenates were separated on a SDS-10% polyacrylamide gel and then transferred into nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA). Non-specific binding sites were blocked with 5% nonfat dry milk for one hour at room temperature in Phosphate-buffered saline

containing 0.1% Tween 20 (PBS-T). They were incubated overnight at 4°C with primary antibodies that targeted specific antibodies (Annexe TK). The following day, membranes were washed 3 times in PBS-T and then incubated for 1 hour at room temperature with the corresponding secondary antibody in 5% nonfat dry milk in PBS-T (Petry *et al.*, 2014). Secondary antibodies that only bind the light chain of Igs was used for AT8 to avoid non-specific signal due to the endogenous Igs. The immunoreactive signal intensity was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL Plus, GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ). Immunoreactive bands were visualized using ImageQuant LAS 4000 imaging system (Fujifilm USA, Valhalla, NY) and densitometric analyses were performed with Image Gauge analysis software (Fujifilm USA, Valhalla, NY).

4.5. Statistical analysis.

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software 4.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA). A D'Agostino and Pearson omnibus normality test was used. The normality test is passed when $p>0.05$ and not passed when $p<0.05$. To compare 2 conditions in male or in female, statistical analyses were performed using an unpaired t-test with two-tailed if the normality test is passed. Otherwise, the statistical analysis was performed using a nonparametric t-test with a Mann-Whitney's *post-hoc* test. The diamond (◆) indicates significant differences between CTL and HFD measured with a t-test. For the ITT and GTT, statistical analysis was performed using a repeated measured two-way AMOVA. To compare male and female in both conditions, statistical analyses were performed using one-way ANOVA of variance followed by a Tukey's *post-hoc* test, if the normality test is passed. But if the Barlett's test indicated significant different variance ($p<0.05$), a Dunnett's *post-hoc* test was used. If the normality test was not passed, the statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's *post-hoc* test. The asterisk (*) indicates significant differences measured with one-way ANOVA. Unless otherwise mentioned, all data are means ± SD.

5. Results

5.1. Impact of a high-fat diet on metabolism.

As expected, a high-fat diet induced obesity in males and females, in both wild-type mice (WT) and hTau mice (Figure 17.A). There was a significant difference between the control (CTL) and the high-fat diet (HFD) condition after a *t-test*. WT and hTau females (F) doubled in weight after a HFD (t-test: WT-F-CTL: 23.45±2.0g vs WT-F-HFD: 48.54±7.4g; ***p=0.0002; hTau-F-CTL: 23.99±2.9g vs hTau-F-HFD: 44.84±4.6g; ***p<0.0001), while the weight of the WT and hTau males (M) increased by 140% (t-test: WT-M-CTL: 37.35±3.2g vs WT-M-HFD: 51.36±3.8g; ***p<0.0001; hTau-M-CTL: 35.76±4.4g vs hTau-M-HFD: 50.67±4.9g; ***p<0.0001). In both conditions, hTau males were heavier than hTau females.

There was no significant difference between the temperature (taken before the death of animals) of the CTL and HFD conditions and between males and females (Figure 17.B). (WT-M-CTL: 37.22±1.2°C; WT-M-HFD: 37.34±0.9°C; WT-F-CTL: 36.59±1.2°C; WT-F-HFD: 37.26±0.6°C; hTau-M-CTL: 36.61±1.0°C; hTau-M-HFD: 36.29±0.8°C; hTau-F-CTL: 37.05±0.7°C; hTau-F-HFD: 36.68±0.8°C).

Fasting blood glucose (Figure 17.C) did not strongly change after a HFD except for WT females and hTau males with a slight but significant increase of glycemia (t-test: WT-F-CTL: 8.39±1.1mmol/L vs WT-F-HFD: 9.76±1.5mmol/L; *p=0.019; hTau-M-CTL : 9.27±1.5mmol/L vs hTau-M-HFD: 10.68±1.2mmol/L; *p=0.023).

Fasting insulin blood (Figure 17.D) levels increased in WT males and females mice after a HFD (t-test: WT-M-CTL: 1.41±0.6µg/L vs WT-M-HFD: 3.18±0.6µg/L; ***p<0.0001; WT-F-CTL: 0.26±0.1µg/L vs WT-F-HFD: 1.49±1.0µg/L; ***p=0.0009). It increased by 220% in males and by approximately 600% in females. Fasting insulinemia in hTau males showed a non-significant increase tendency (t-test: hTau-M-CTL: 0.95±0.9µg/L vs hTau-M-HFD: 1.82±1.12µg/L; p=0.060), and it increased by approximately 400% in hTau females (t-test: hTau-F-CTL: 0.29±0.2µg/L vs hTau-F-HFD: 1.08±0.7µg/L; **p=0.0011). Males WT had higher insulin blood levels than females in both conditions.

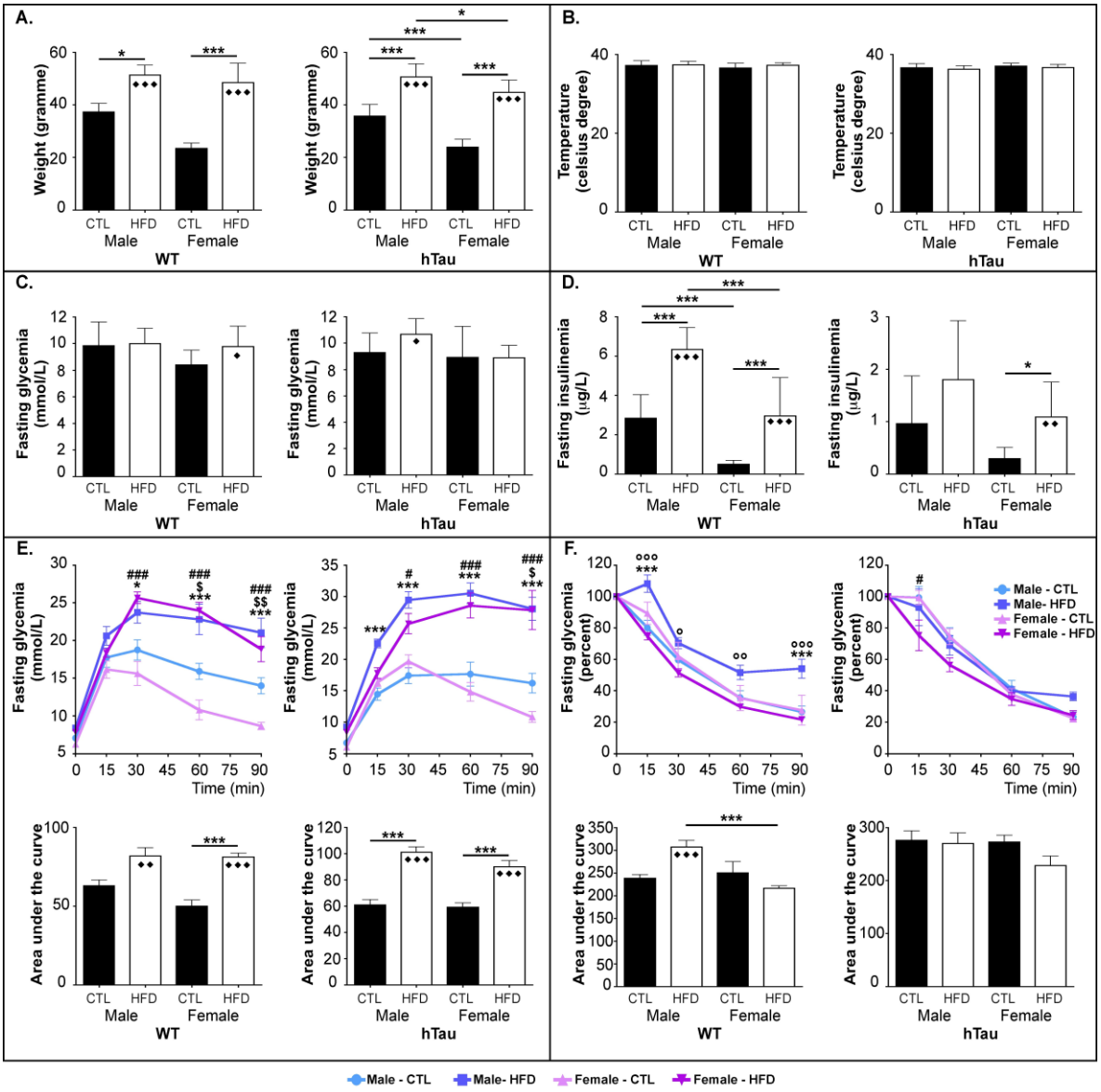

Figure 17 : Effect of HFD on metabolic features in female and male mice.

Weight, temperature, fasting glycemia, fasting insulinemia, Glucose Tolerance Test (GTT) and Insuline Tolerance Test (ITT) of mice at sacrifice. (A) Weight is express in gram. (B) Temperature is express in Celsius. Fasting glycemia is express on mmol/L. (D) Fasting insulinemia is express on µg/L. (E) GTT is express in mmol/L. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions and all data are means ± SD. (F) ITT is express as percentage of glycemia at time 0 of each individu. A t-test was used to compare the HDF and CTL condition of males and females and a One-way ANOVA was used to compare the 4 groups. Diamonds indicate significant differences between CTL and HFD after a t-test, with ◆◆◆p<0.001, ◆◆p<0.01, ◆p<0.05. Asterisks indicate significant differences after a One-way ANOVA, with ***p<0.001, **p<0.01 and *p<0.05.

For the GTT and ITT graph, Two way ANOVA was used to compare groups according to time. Asterisks indicate significant differences of M-CTL with M-HFD, with ***p<0.001, **p<0.01 and *p<0.05. Dollars indicate significant differences of M-CTL with F-CTL, with $<0.05. Circle indicate significant differences of M-HFD with F-HFD, with °°°p<0.001, °°p<0.01 and °p<0.05. Hashtag indicate significant differences of F-CTL with F-HFD, with ###p<0.001 and ##p<0.01. Data for both graphs E and F are means ± SEM.

The pre-sacrifice glucose tolerance test (GTT) showed glucose intolerance that appeared after the HFD in WT and hTau mice of both sexes (Figure 17.E) and the area under the fasting glycemia-time curve indicated a significant increase (t-test: WT-M: **p=0.0091; WT-F: ***p=0.0001; hTau-M and hTau-F: ***<0.0001).

The pre-sacrifice insulin tolerance test (ITT) did not reveal differences in insulin resistance in females or in hTau male after a HFD (Figure 17.F) but did in males WT. The area under the fasting glycemia-time curve confirmed that WT males were more insulin resistant after a HFD (t-test: ***p<0.0001). Furthermore, WT males were more insulin resistant than females in the HFD condition.

5.2. Impact of a high-fat diet on tau phosphorylation and aggregation.

We investigated tau phosphorylation of various epitopes that are phosphorylated in physiological and pathological conditions (namely Ser202, Thr205, Ser199, Ser396, Ser404), and an epitope that is phosphorylated only in pathological conditions (namely Ser422) (Martin et al, 2011). We studied these epitopes in the cortex and hippocampus of WT and hTau mice. There was an increase after the HFD in tau phosphorylation in WT male on Ser199 (t-test: *p=0.048) and Thr205 (t-test: *p=0.029) epitopes as well as on epitopes recognized by PHF1 (t-test: *p=0.010) antibody (Ser396/Ser404). There was a decrease in Tau1 phosphorylation for WT males (t-test: *p=0.047) and Tau1 antibody recognizes dephosphorylated epitopes. This indicates that number of non-phosphorylated epitopes decreased after a HFD for WT males. Neither WT males nor females increased in abnormal phosphorylation on Ser422. Conversely, we observed a significant decrease in tau phosphorylation in WT females for the CP13 (t-test: *p=0.033) and PHF1 (t-test: *p=0.040) antibodies. We also noticed an increase in total tau (TauC) for WT females (t-test: *p=0.034). All these differences on tau phosphorylation are not observed in the hippocampus (Figure S1.A). We only noticed a decrease of tau phosphorylation at PHF1 epitope in WT males (t-test: **p=0.0089). There was no change in tau phosphorylation neither in the hippocampus nor the cortex for both males and females hTau mice (Figure 18.B et S1.B).

No modification of tau aggregation was observed in the cortex of hTau mice (Figure 19). We did not study tau aggregation in WT mice because endogenous tau is not known to be aggregative.

5.3. Impact of a high-fat diet on the main tau kinase and phosphatase.

To understand how obesity can modulate tau phosphorylation, we investigated one possible mechanism, which is the insulin-signalling pathway. We observed in the cortex (t-test: **p=0.0063; Figure 20.A) and hippocampus (t-test: **p=0.0026; Figure S2.A) of WT males mice, a significant increase in the glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3β) activation, the main tau kinase (Ishiguro *et al.*, 1993), after a HFD, *via* the decrease of its phosphorylation on the serine 9 (S9). S9 phosphorylation reduces the activity of GSK3-β (Sutherland *et al.*, 1993). To explain this decrease in phosphorylation, we looked at Akt, a kinase involved in the insulin-signalling pathway that directly modulates the activity of GSK-3β (Cross *et al.*, 1995). Phosphorylation of Akt decreased in WT males mice after a HFD and the difference was more significant in their cortex (t-test: **p=0.0026) than in their hippocampus (t-test: *p=0.031). However we did not see any change in Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) or insulin receptor (IR) phosphorylation for WT males. The hTau males (t-test: **p=0.0043; Figure 20.B) showed an increase in IR phosphorylation on beta-receptor on the threonine Y1345 after a HFD in the cortex. In the cortex of WT females, Akt increased after a HFD (t-test: *p=0.044).

Nevertheless, we observed a more important phosphorylation in the cortex of females compared to males in the HFD condition for, pAkt, Akt, S9, PI3K. In the hippocampus, we observed that WT female had more phosphorylation of IR than male. The S9 phosphorylation is also less important in female than in males in the CTL group for WT females.

No modification of methylation of PP2A on its C subunit was observed in WT and hTau mice, either in the cortex of the hippocampus, for both sexes (Figure 21). Nevertheless an increase in the number of total PP2AC in the cortex (t-test: *p=0.044) of WT females (Figure 21.A) and a decrease in the hippocampus (t-test: *p=0.043) of WT male (Figure 21.C) was observed. We also noticed more PP2AC in females than in males in the HFD condition for WT mice in the cortex and in the hippocampus.

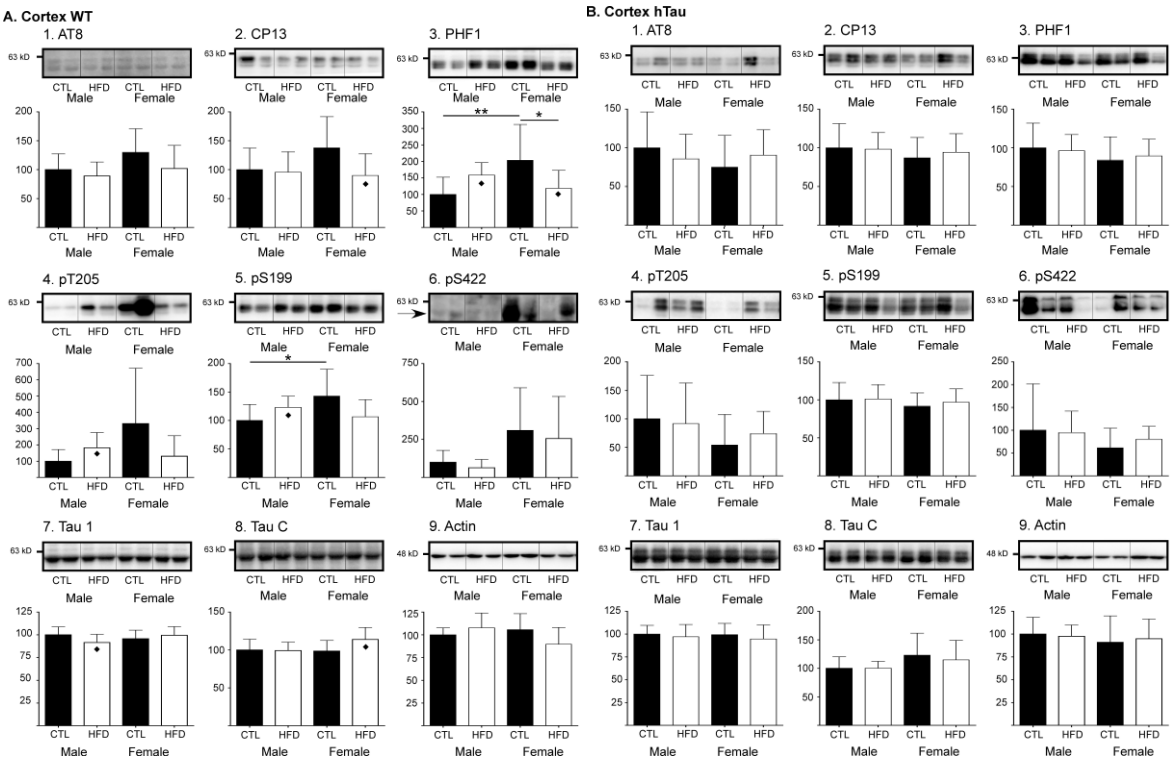

Figure 18 : Phosphorylation of tau protein epitopes in the cortex of WT and hTau mice.

Phosphorylation of tau protein's epitopes in the cortex of WT mice (A) and in the cortex of hTau mice (B). Antibodies like 1.AT8, 2.CP13 and 3.PHF1 were used to recognize different epitopes when they are phosphorylated on Ser202/Thr205, Ser202 and Ser396/Ser404 respectively and other antibodies were used to recognize 4.Thr205, 5.Ser199, 6.Ser422 when they are phosphorylated. 7.Tau1 and 8.TauC recognize respectively non-phosphorylated tau at Ser195/Ser198/Ser199/Ser202 and C-terminal of tau protein. Two lanes from representative immunoblots are displayed for each condition. Quantifications of phospho-epitopes were performed vs total tau. Total tau quantification was performed vs 9.β-actin. Results are expressed as percentage of CTL male group. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions in male and female and One-way ANOVA was used to compare 4 groups. Diamonds indicate significant differences between CTL and HFD after a t-test, with ⬥$p<0.05$. Asterisks indicate significant differences after a One-way ANOVA, with **$p<0.01$ and *$p<0.05$. All data are means ± SD.

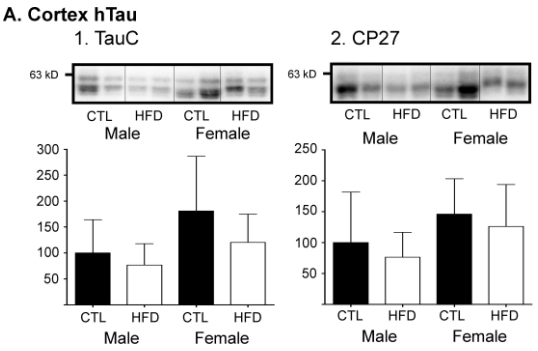

Figure 19 : Aggregation of human tau protein in the cortex of hTau mice.

Different antibodies were used to recognize the total tau 1.TauC and 2.CP27 which recognize respectively the C terminal of tau protein and amino-acids 140-160 of tau protein. Two lanes from representative immunoblots are displayed for each condition. Results are expressed as percentage of CTL male group. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions in male and female and One-way ANOVA was used to compare 4 groups. All data are means ± SD.

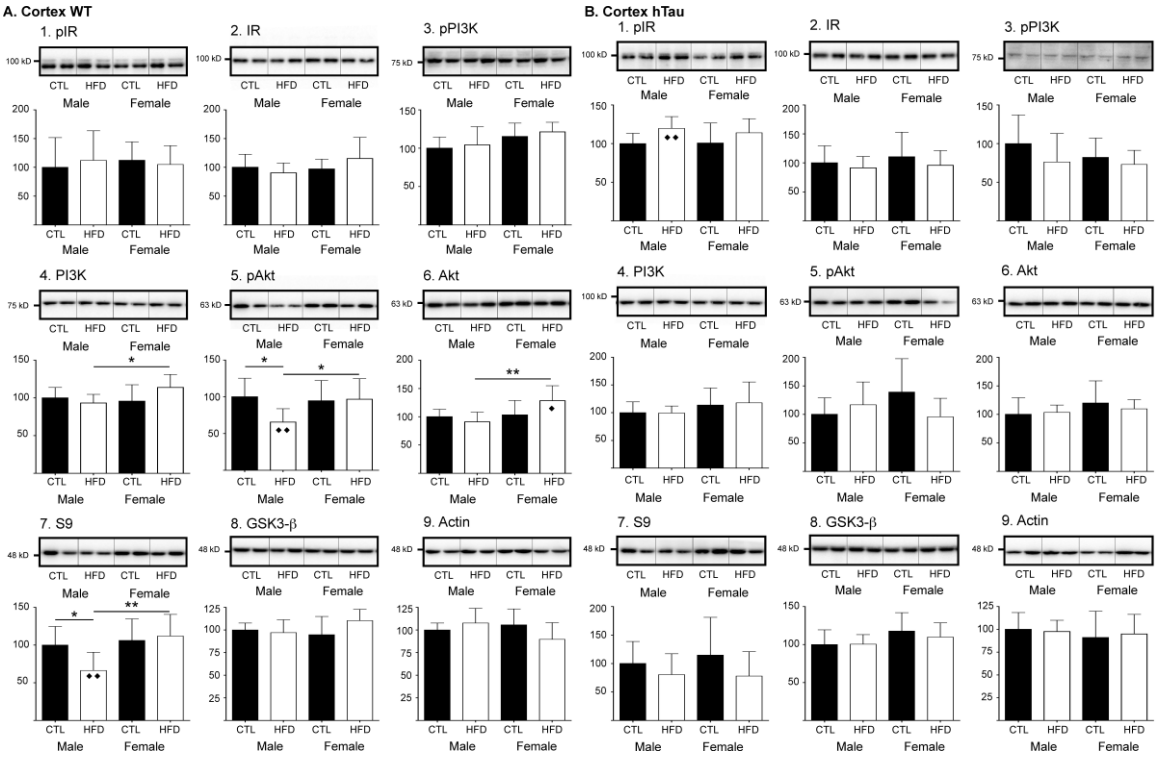

Figure 20 : Phosphorylation of different kinases and the insulin receptor in the cortex of WT and hTau mice.

Phosphorylation of different kinase and the insulin receptor in the cortex of WT mice (A) and the cortex of hTau mice (B). Different antibodies were used to recognize the insulin receptor (IR) phosphorylated (1.pIR) and total (2.IR), different kinases like PI3K phosphorylated (3.pPI3K) and total (4.PI3K), Akt phosphorylated (5.pAkt) and total (6.Akt) and GSK-3β phosphorylated on S9 (7.S9) and total (8.GSK3β) and when they are phosphorylated. Two lanes from representative immunoblots are displayed for each condition. Quantifications of phosphorylated-form were performed vs its total form. Total form quantification was performed vs 9.β-actin. Results are expressed as percentage of CTL male group. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions in male and female and One-way ANOVA was used to compare 4 groups. Diamonds indicate significant differences between CTL and HFD after a t-test, with ◆◆p<0.01, ◆p<0.05. Asterisks indicate significant differences after a One-way ANOVA, with **p<0.01 and *p<0.05. All data are means ± SD.

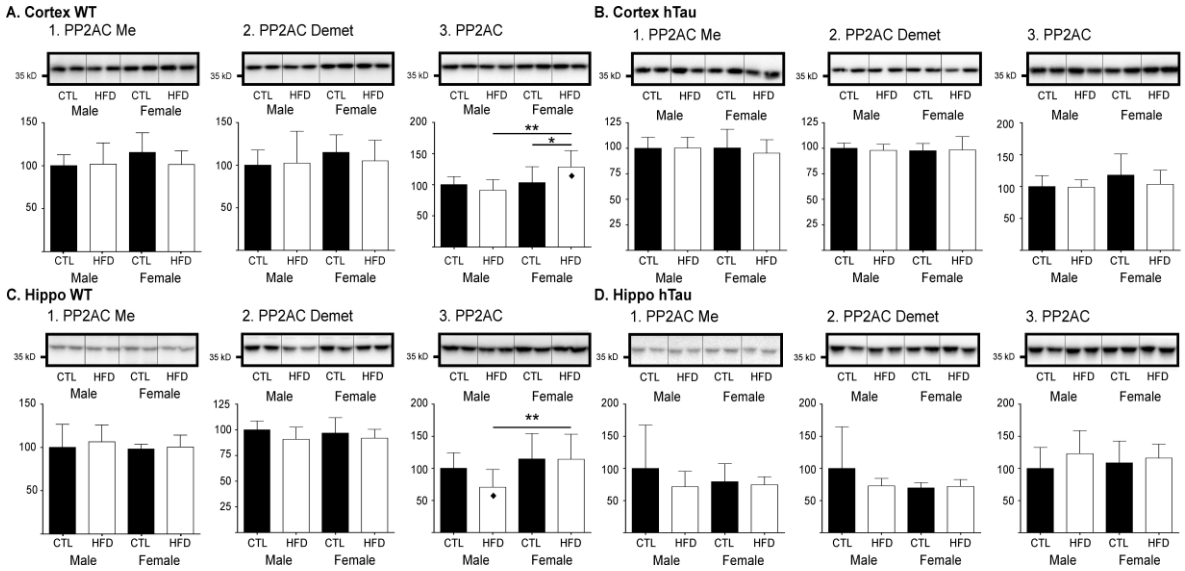

Figure 21 : Methylation and Demethylation of the main phosphatase of tau in the cortex and the hippocampus of WT and hTau mice.

Methylation and demethylation of PP2A in the cortex of WT mice (A) and hTau mice (B). Methylation of PP2A in the hippocampus of WT mice (C) and hTau mice (D). Different antibodies were used to recognize the C subunit of PP2A when they are methylated (1.PP2AC Me), demethylated (2.PP2AC Demet) and their total form (3.PP2AC). Two lanes from representative immunoblots are displayed for each condition. Quantifications of methylated and dimethylated-form were performed vs its total form. Total form quantification was performed vs β-actin. Results are expressed as percentage of CTL male group. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions in male and female and One-way ANOVA was used to compare 4 groups. Diamonds indicate significant differences between CTL and HFD after a t-test, with ◆$p<0.05$. Asterisks indicate significant differences after a One-way ANOVA, with **$p<0.01$ and *$p<0.05$. All data are means ± SD.

6. Discussion

Tau protein modification has been observed independently of insulin resistance. As in the study by Leboucher *et al.*, tau phosphorylation increases in male THY-Tau mice after a 60% kcal from fat diet without insulin resistance, according to the homeostasis model assessment of insulin resistance test and the ITT (Leboucher *et al.*, 2013). Similarly, Takalo *et al.* recorded increased tau phosphorylation and increased 4R/3R ratio in female APdE9 after a HFD at 21% calories from fat, without correlation between glucose and insulin levels (Takalo *et al.*, 2014). Increased tau phosphorylation without insulin resistance was further observed in female mice mutated on P301S (Koga *et al.*, 2014) and in male WT (Petrov *et al.*, 2015). This contrasts, a previous study conducted in our laboratory with hTau mice, a model of AD expressing human tau protein, which showed no increase in tau phosphorylation after a HFD at 45% kcal from fat (Gratuze *et al.*, 2016). Mice of both sexes were studied together and did not develop insulin resistance or glucose intolerance despite heavy weight gain. A HFD at 45% Kcal from fat was chosen since it is the one closer to that of American diets (the USDA report, Gerrior *et al*., 2004). In the present study, we used a HFD at 60% kcal from fat because this was the most common diet for mice presented in the literature for obesity studies (Jeon *et al.*, 2012; Barron *et al.*, 2013; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; Knight *et al.*, 2014; Vandal *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2017; Salas *et al.*, 2018) and because the metabolism of mice is seven times faster than that of humans (Demetrius, 2005). We included WT mice to determine if the lack of change in the hTau mice was due to the model and we studied males and females separately because of the contrasting results recorded between sexes.

We observed an increase in weight in WT and hTau mice of both sexes after a HFD. If the GTT showed glucose intolerance in WT and hTau mice after a HFD, ITT showed insulin resistance only in WT males. It is noteworthy that only the WT male group had an increase in tau phosphorylation on three epitopes. This may be explained by decreased PP2AC expression with increased GSK3-β activation *via* decreased activation of Akt. In females, the decrease in phosphorylation may be caused by the increase in PP2AC expression. GSK3-β is a tau protein kinase (Ishiguro *et al.*, 1993) whose inhibition by lithium reduces tau phosphorylation (Hong *et al.*, 1997). An increased level of active GSK3-β has been observed in AD (Leroy *et al.*, 2007) and is related to the insulin-signaling pathway (Jolivalt *et al.*, 2008). It has been shown that GSK3-β phosphorylates various tau epitopes such as: Ser199 and Thr205 (Wang *et al.*, 1998), and PHF1 (Lucas *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2006). This explains the increased tau phosphorylation on these three specifics epitopes in males. We studied PP2A because it is the main tau phosphatase (Torrent and Ferrer, 2012) and studies show that the amount of PP2A decreases in AD and that the amount of PP2A catalytic subunit (PP2AC) inhibitor

increases (Chen *et al.*, 2008). As such, we also studied the methylated and demethylated form of PP2AC. Although articles show that AD may be due to an imbalance between kinases and phosphatases (Wang *et al.*, 2007), the mechanism leading to this imbalance remains unknown. Studies have shown that the insulin pathway may be responsible for this imbalance (Planel *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2011) but it appears that tau phosphorylation is in fact a direct consequence of hypothermia (Planel *et al.*, 2004). Since our findings show that there was no decrease in temperature after a HFD and only the insulin resistant group exhibited hyperphosphorylation of tau, obesity and insulin resistance may then be risk factors for WT mice only.

Indeed, in the Jeon *et al.* study, on WT males, hyperphosphorylation of tau was observed after 5 months of 60% Kcal from fat diet, with decreased activity in the IR and 5' adenosine monophosphataste-activated protein kinase (AMPK), and increased activation of the tau kinase GSK3-β (Jeon *et al.*, 2012). There was also an increase tau phosphorylation and in the activation of JNK and IRS-1 in WT mice in other study (Kothari *et al.*, 2017). Similarly, Bhat *et al.* recorded an increase in tau phosphorylation and GSK3-β activation, with a decrease in Akt activation (Bhat and Thirumangalakudi, 2013). Conversely, HFDs do not always induce tau phosphorylation in WT mice. Becker *et al*. demonstrate that, despite the weight gain of WT mice and increased insulin levels in the blood, the ITT and GTT did not change after the HFD and the mice did not have increased tau phosphorylation or GSK3-β activation (Becker *et al.*, 2012). Tau phosphorylation did not increase in studies by Ramos-Rodriguez *et al.,* and Leboucher *et al.,* despite the weight gain of WT mice and the increase in insulin and glucose levels in the blood (Leboucher *et al.*, 2013; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013).

In hTau mice, we observed neither an increase in insulin resistance after ITT nor changes in tau phosphorylation nor in activation of components of the signalling pathway, the tau kinases and the phosphatase. This may suggest that the human tau protein or the absence of the murine tau leads to natural HFD resistance. The absence of effects in the hTau mice, unlike the WT mice, shows us the importance of studying WT mice in addition to the transgenic model.

We hypothesized that the human tau protein may have a different role than murine tau protein to explain the lack of results in hTau mice. Moreover, in the absence of murine tau protein (tau knock-out), IRS-1 and PTEN were altered which modified the response of the hippocampus to insulin (Marciniak *et al.*, 2017). It is possible that the human tau protein does not allow this alteration to be restored, which would explain why hTau mice without the murine tau protein might be naturally insulin resistant. This would explain the absence of difference between the CTL and HFD condition.

This study reinforces the hypothesis that changes in insulin and its signalling pathway can be both a cause and a consequence of AD (Stanley *et al.*, 2016; Gratuze *et al.*, 2018).

The different results obtained in males and females WT demonstrate the importance of studying them separately. Other articles that have investigated males and females separately showed a sex-based difference in results after a HFD. A study by Takalo *et al.*, for example, shows an increase in the 4R/3R ratio and the hyperphosphorylation of AT8 only in females and not in males (Takalo *et al.*, 2014). Another article shows that 3xTg-AD males have a drop in their testosterone after a HFD and develop hyperglycaemia and insulin resistance. However, despite a decrease in memory, there is no change in tau phosphorylation. Conversely, females are not hyperglycaemic and their estradiol levels do not change but, after an ovariectomy, they observe hyperglycaemia and an increase in insulin resistance. This could explain why we did not see an increase in insulin resistance in WT female after a HFD (Barron *et al.*, 2013).

It is noteworthy that some studies include females because they would have more AD-like pathology than males (Koga *et al.*, 2014; Vandal *et al.*, 2014). However, even if the articles cited by Vandal *et al.* show a sexual dimorphism that correlates with age, the increase in pathology is visible on behaviour and amyloid plaques but not on tau pathology (Clinton et al., 2007; Hirata-Fukae et al., 2008; Bories et al., 2012).

In conclusion, increased tau phosphorylation in WT males may be caused by the increased GS3Kβ activation and the decreased PP2A expression that is associated with insulin resistance. In females, decrease tau phosphorylation may be caused by increased PP2A expression. Obesity without insulin resistance does not induce hyperphosphorylation and aggregation of tau in hTau mice. This study suggests that hTau mice may not be a good model for studying the involvement of insulin in AD since the absence of murine tau or the presence of human tau may cause insulin resistance. Conclusively, it is important to study males and females separately since they have a different metabolism and hormonal composition.

7. Supplementary data

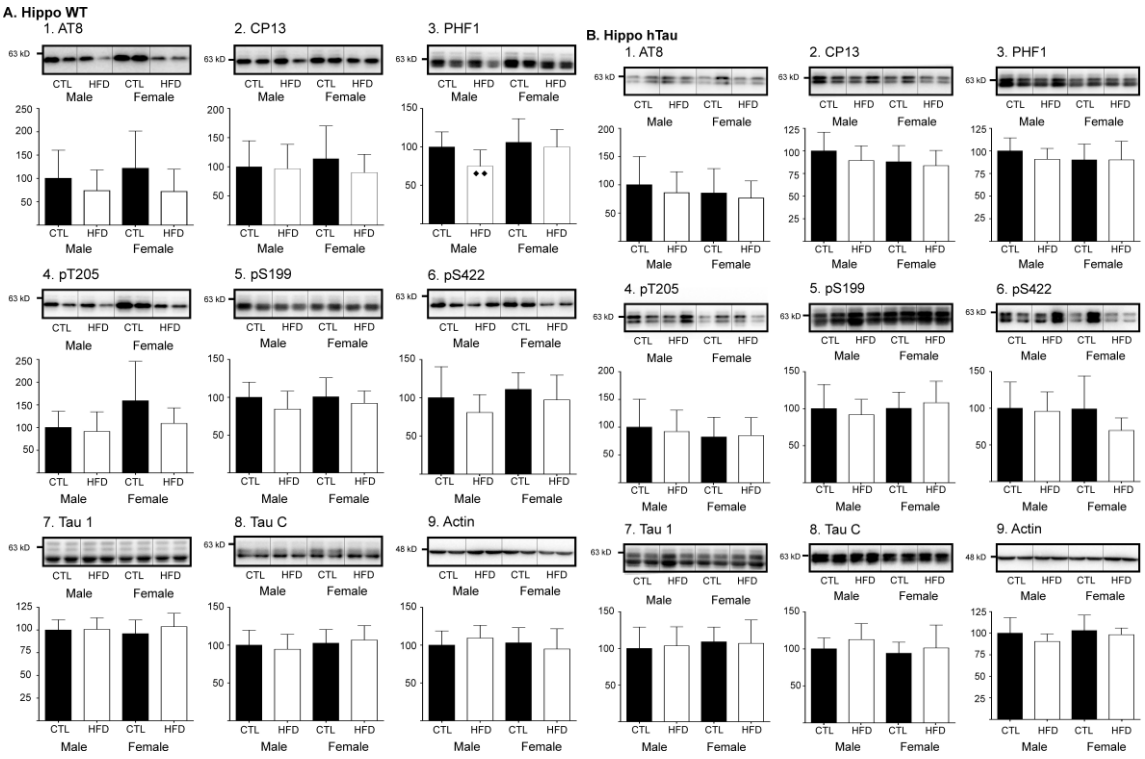

Figure S1 : Phosphorylation of tau protein epitopes in the hippocampus of WT and hTau mice.
Phosphorylation of tau protein's epitopes in the hippocampus of WT mice (A) and in the hippocampus of hTau mice (B). Antibodies like 1.AT8, 2.CP13 and 3.PHF1 were used to recognize different epitopes when they are phosphorylated on Ser202/Thr205, Ser202 and Ser396/Ser404 respectively and other antibodies were used to recognize 4.Thr205, 5.Ser199, 6.Ser422 when they are phosphorylated. 7.Tau1 and 8.TauC recognize respectively non-phosphorylated tau at Ser195/Ser198/Ser199/Ser202 and C-terminal of tau protein. Two lanes from representative immunoblots are displayed for each condition. Quantifications of phospho-epitopes were performed vs total tau. Total tau quantification was performed vs 9.β-actin. Results are expressed as percentage of CTL male group. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions in male and female and One-way ANOVA was used to compare 4 groups. Diamonds indicate significant differences between CTL and HFD after a t-test, with ◆◆$p<0.01$. All data are means ± SD.

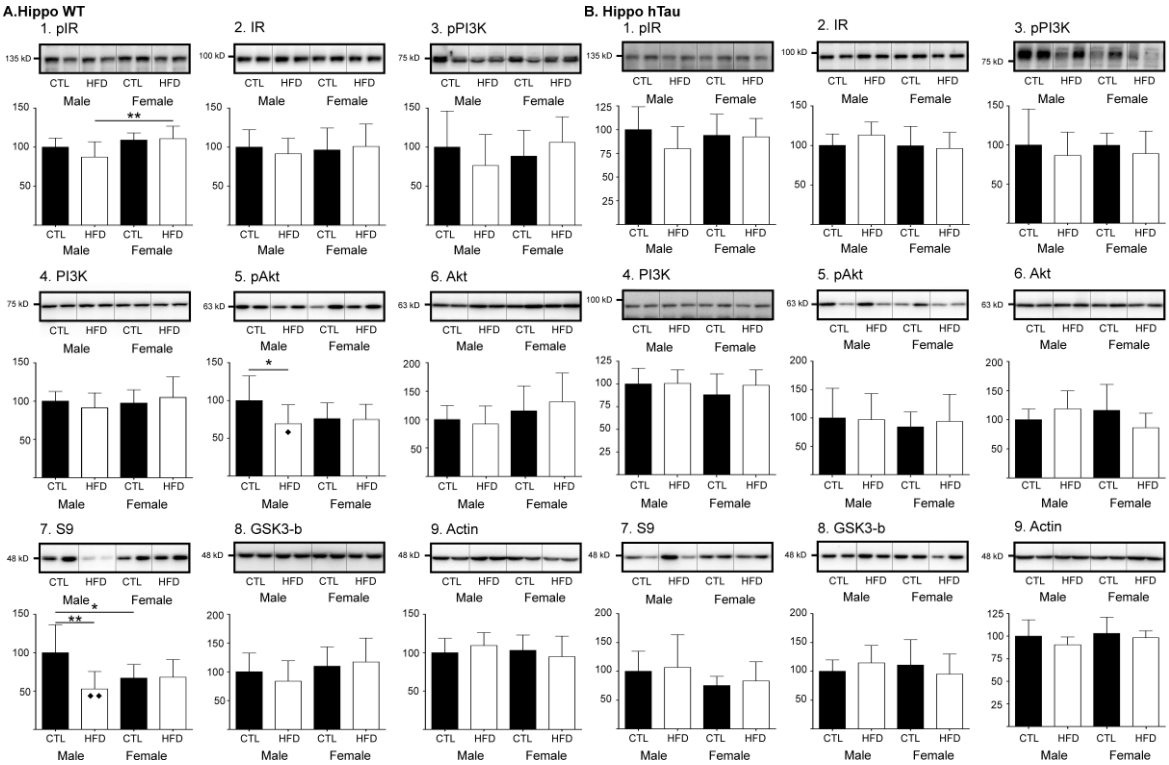

Figure S2 : Phosphorylation of different kinases and the insulin receptor in the cortex of WT and hTau mice.

Phosphorylation of different kinase and the insulin receptor in the cortex of WT mice (A) and the cortex of hTau mice (B). Different antibodies were used to recognize the insulin receptor (IR) phosphorylated (1.pIR) and total (2.IR), different kinases like PI3K phosphorylated (3.pPI3K) and total (4.PI3K), Akt phosphorylated (5.pAkt) and total (6.Akt) and GSK-3β phosphorylated on S9 (7.S9) and total (8.GSK3β) and when they are phosphorylated. Two lanes from representative immunoblots are displayed for each condition. Quantifications of phosphorylated-form were performed vs its total form. Total form quantification was performed vs 9.β-actin. Results are expressed as percentage of CTL male group. A t-test was used to compare CTL and HFD conditions in male and female and One-way ANOVA was used to compare 4 groups. Diamonds indicate significant differences between CTL and HFD after a t-test, with ◆◆p<0.01, ◆p<0.05. Asterisks indicate significant differences after a One-way ANOVA, with **p<0.01 and *p<0.05. All data are means ± SD.

Chapitre 2 : Discussion et perspective

1. Retour sur les résultats et limites

Mon projet de recherche avait pour but de confirmer l'étude de Gratuze *et al.* sur l'absence d'effets sur la protéine tau d'un régime riche en gras chez les souris hTau (Gratuze *et al.*, 2016). Même avec un régime plus calorique, les souris hTau ne développent pas de résistance à l'insuline ou d'hyperphosphorylation de tau. Seuls les mâles WT, résistants à l'insuline, montrent une hyperphosphorylation de tau sur 3 des épitopes étudiés tandis que les femelles présentent une diminution de la phosphorylation de tau sur 2 des épitopes étudiés. Ces résultats ne permettent pas de confirmer mon hypothèse qui était que l'obésité seule, sans troubles métaboliques, pouvait aggraver la pathologie tau.

La différence de résultats entre les deux sexes chez les souris WT pourrait être due aux hormones puisque nous avons vu dans l'article de Barron *et al.*, une diminution du taux de testostérone et une résistance à l'insuline chez les mâles, tandis que les femelles n'ont pas de diminution du taux d'estrogènes et pas de résistance à l'insuline. Cependant, après une ovariectomie et donc une diminution du taux d'estrogènes, les femelles développent une résistance à l'insuline (Barron *et al.*, 2013). Bien que ces résultats soient observés chez des souris 3x-Tg et non WT, il aurait été intéressant de **mesurer le taux d'hormones** des souris au cours de l'étude. Une autre étude montre qu'une augmentation des **lymphocytes T régulatrices anti-inflammatoires** (**T_{reg}** pour *anti-inflammatory regulatory T-lymphocytes* en anglais) dans le tissu adipeux des femelles, sous un régime riche en gras (HFD), permettrait de les protéger contre les altérations métaboliques. Des altérations métaboliques sont d'ailleurs observées chez les mâles qui eux ne sont pas protégés par l'augmentation des T_{reg} puisque leur nombre a plutôt tendance à diminuer (Pettersson *et al.*, 2012). De plus, une étude montre une altération des capacités cognitives chez les hommes atteints d'obésité mais pas chez les femmes (Elias *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2005). D'autres études montrent un dimorphisme sexuel qui corrèle avec l'âge, néanmoins, bien que l'augmentation de la pathologie de la MA soit visible sur les plaques amyloïdes elle ne l'est pas sur celle de tau (Clinton et al., 2007; Hirata-Fukae et al., 2008; Bories et al., 2012).

Bien que les différences métaboliques et hormonales entre les mâles et les femelles puissent expliquer la différence de résultats chez les souris WT, **l'absence d'effet chez les souris hTau** est surprenante mais corrèle avec l'étude précédente (Gratuze *et al.*, 2016). Nous pensions qu'un régime plus calorique permettrait d'induire une résistance à l'insuline chez les souris hTau et donc d'induire une hyperphosphorylation de tau. Cela nous aurait permis de postuler que l'obésité seule ne semble pas

induire d'hyperphosphorylation de tau dans le modèle hTau, mais que si elle est accompagnée d'une résistance à l'insuline, une hyperphosphoryaltion de tau est observée. Or, aucune résistance à l'insuline (mesurée par un ITT) et aucune hyperphosphorylation, n'est observée chez les souris hTau après un régime à 60% de Kcal de gras comparées aux souris hTau sous régime contrôle. Ce résultat reste consistant avec deux autres études utilisant un modèle qui exprime la protéine tau humaine : les P301S (Koga *et al.*, 2014) et les THY-Tau22 (Leboucher *et al.*, 2013). Aucune augmentation de la résistance à l'insuline mesurée par un ITT n'a été observée après un HFD dans ces deux études. Cependant, une hyperphosphorylation est présente après le HFD dans les deux modèles, ainsi qu'une augmentation de l'activation de certaines kinases de tau.

Pourquoi le modèle hTau ne présente pas une hyperphosphorylation et une agrégation de tau après un HFD ?

Le modèle **hTau** semble présenter une **résistance au régime riche en gras** et ce phénomène vient peut-être du fait que les souris hTau sont obtenues après croisement avec des souris tau *knock-out* (TKO), qui n'expriment plus la protéine tau murine mais expriment la protéine tau humaine (Andorfer *et al.*, 2003; Andorfer *et al.*, 2005). Or, l'étude très complète de Marciniak *et al.*, faite sur les **souris TKO** a permis de mettre en évidence que la délétion de tau conduit à une **résistance à l'insuline dans l'hippocampe** des souris, via la liaison de tau avec PTEN qui est diminuée. De plus, **les souris TKO** développent également une **résistance à l'insuline en périphérie** ainsi qu'une augmentation de la prise alimentaire lorsqu'elles sont comparées à des souris WT (Marciniak *et al.*, 2017). Néanmoins, dans notre étude avec un régime riche en gras à 60% de Kcal, nous ne retrouvons pas cette différence de la résistance à l'insuline entre les souris hTau et WT, qui pourrait montrer une résistance à l'insuline propre au modèle hTau (les données ne sont pas montrées). Cependant, une étude en cours dans le laboratoire a mis en évidence une intolérance au glucose chez les souris hTau HFD et les souris TKO comparées aux souris WT. À la suite de ces résultats, une étude préliminaire a été faite dans le laboratoire avec différentes lignées de souris TKO comparées aux souris WT et nous pouvons observer une intolérance au glucose plus importante chez les souris TKO mâles et femelles. Le croisement entre les souris WT et TKO permet de restaurer la tolérance au glucose (Figure 22). Un seul exemplaire de MAPT murin permet d'empêcher l'altération du métabolisme contrairement au MAPT humain. Cette étude en cours pourrait amener des connaissances nouvelles sur le rôle de tau dans le métabolisme périphérique (muscle et gras) et central du glucose (hippocampe).

Ensuite, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'obésité chez des souris jeunes car le modèle hTau développe une pathologie tau à partir de 9 mois (Polydoro *et al.*, 2009) et nous voulions voir si le HFD pouvait accélérer le développement de la pathologie. Cependant, nous avons vu que l'obésité était un facteur de risque lorsqu'elle est présente en milieu de vie, vers l'âge de 40 ans (Kivipelto *et al.*, 2005; Beydoun *et al.*, 2008), ce qui correspond environ à un âge de **12 mois** chez la souris (Dutta and Sengupta, 2016). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'un HFD chez des **souris plus âgées**. Néanmoins, dans les études (Tableau 1) où les souris ont été sacrifiées entre l'âge de 12 et 20 mois, à la suite d'un HFD d'une durée de 10 à 18 mois, aucune hyperphosphorylation de tau n'a été observée (Julien *et al.*, 2010; Knight *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2017; Salas *et al.*, 2018), sauf chez les souris sacrifiées à l'âge de 11,5 mois, après une diète de 10 mois, où une hyperphosphorylation de tau a été observée (Koga *et al.*, 2014). Il est donc difficile de comprendre les mécanismes impliqués chez l'humain pour expliquer que l'obésité puisse être un facteur de risque pour la MA. Il est possible que l'obésité n'affecte pas la phosphorylation de tau mais que d'autres facteurs tels que les problèmes vasculaires associés à une diminution de la clairance d'amyloïde, puissent intervenir. D'ailleurs dans notre étude, la diète riche en gras a entrainé une prise de poids plus importante chez la femelle mais les effets rapportés sont observés chez le mâle et non la femelle.

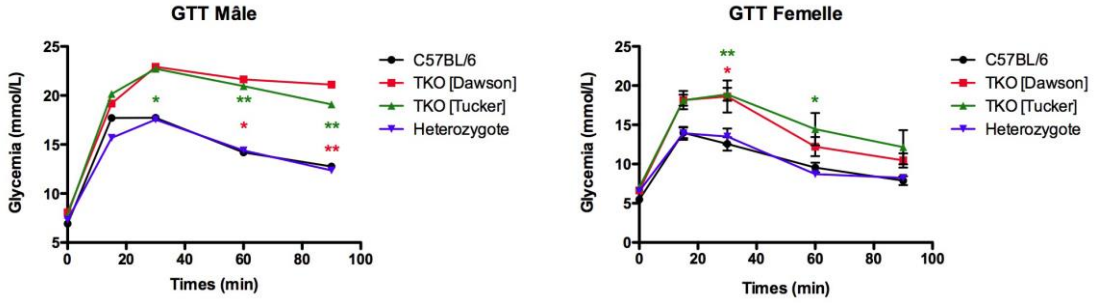

Figure 22 : Effets de la protéine tau murine sur la tolérance au glucose.
Test de tolérance au glucose (GTT) chez des souris mâles ou femelles C57BL/6, TKO et hétérozygotes pour le gène de Tau. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport aux souris C57BL/6, avec * p <0,05 et ** p <0,01. Source : (Gratuze *et al.*, en préparation).

Il aurait été judicieux d'inclure des tests de comportements et de mémoire à notre étude puisque des baisses de la mémoire peuvent être observées malgré l'absence d'hyperphosphorylation de tau (Knight *et al.*, 2014). Cependant, il est important de tester les capacités motrices des souris avec un test *open-field* avant de procéder à un test de mémoire nécessitant la mobilité des souris, puisque l'obésité peut diminuer leur capacité locomotrice. Une altération de la cognition est observée chez des souris obèses (Farr *et al.*, 2008) ainsi que chez les personnes atteintes d'obésité (Gunstad *et al.*, 2010), mais il semblerait que les hommes soient plus concernés que les femmes (Elias *et al.*, 2005).

L'obésité, qu'elle soit un facteur de risque direct pour la MA ou non, semble altérer les capacités cognitives et est un facteur de risque du DT2 mais également un facteur de risque de la MA. Donc, même si les mécanismes sont encore inconnus, il est important de diminuer ces facteurs de risque pour diminuer les cas de MA.

2. Perspectives

Parmi les perspectives que mon projet m'a amenée à penser, nous allons voir les trois principales.
À l'heure actuelle, aucune étude n'a évalué le rôle de la pathologie tau sur les altérations métaboliques vues dans la MA. Il serait donc intéressant d'étudier le métabolisme du glucose chez des souris hTau, TKO et WT, en séparant les sexes. De plus, une invalidation de MAPT chez certaines souris hTau et TKO permettrait d'étudier les différences métaboliques avant et après l'invalidation du gène de la protéine tau murine. Nous pourrions voir si les souris « hTau », avec la protéine tau murine, sont moins résistantes à l'insuline qu'après l'invalidation du gène, ce qui montrerait le rôle de la protéine tau murine dans la signalisation à l'insuline. Par ailleurs, nous pourrions confirmer que la perte de la protéine tau murine conduit à une altération du métabolisme chez les souris TKO. Nous pourrons mesurer les niveaux des transporteurs du glucose cérébraux (GLUT 1 et GLUT 3) et de l'insuline cérébrale et périphérique, l'activation des récepteurs à l'insuline, ainsi que des autres composants de la voie de signalisation à l'insuline et des différentes kinases et phosphatases de tau. Il serait également intéressant de regarder les taux d'hormones qui peuvent jouer sur la résistance à l'insuline, comme nous l'avons vu, ainsi que la mémoire. Cette étude serait d'autant plus pertinente si elle était effectuée sur des souris de différents âges, avec des souris jeunes âgées de 8 mois, des souris en milieu de vie de 12 mois et des souris âgées de 20 mois ou plus.

Ensuite, l'autre perspective est toujours d'étudier l'impact d'un régime riche en gras sur des souris hTau mais en utilisant une autre méthode pouvant conduire à une résistance à l'insuline, pour voir si les souris hTau sont capables d'en développer une et si, de cette manière, la pathologie tau est exacerbée. Un croisement entre des souris hTau et des modèles de DT2 pourrait être utilisé, ou encore une combinaison de faibles doses de streptozotocine (STZ) couplées à un régime riche en gras. Cette méthode a été développée notamment par Gilbert *et al.* Ils ont déterminé que 3 doses de 40mg/kg de STZ, injectées 3 semaines après le début du régime riche en gras à 60% de Kcal, sont suffisantes pour induire un DT2 chez des souris, mais pas assez pour basculer sur un DT1 (Gilbert, Fu et Liu, 2011). La STZ permet de détruire les cellules β des îlots de Langerhans, donc un contrôle régulier du poids des souris devra être effectué pour vérifier que les souris ne développent pas un DT1, pouvant être

caractérisé par une perte et poids (Diabète Québec). La température aussi devra être mesurée grâce à des *body cap*, qui sont des capsules placées dans le corps des souris et reliées à une machine qui enregistre la température corporelle. En effet, une étude montre que l'injection de STZ peut conduire à des altérations métaboliques profondes menant à une hypothermie qui serait la cause de l'hyperphosphorylation de tau, puisque si la normothermie est rétablie, l'hyperphosphorylation de tau est réduite (Planel *et al.*, 2007). Des souris WT et hTau des deux sexes seront donc soumises à des injections de STZ ou des injections contrôles, couplées ou non à un régime riche en gras.

De plus, si l'absence de tau chez les souris TKO conduit à une altération de la voie de signalisation, il serait intéressant de voir si une augmentation de la phosphorylation de tau, en surexprimant GSK3β dans un modèle murin par exemple, conduit aux mêmes résultats. En effet, nous pouvons nous attendre aux mêmes résultats que chez les souris TKO, puisque l'hyperphosphorylation de tau devrait diminuer ses capacités fonctionnelles telle que la régulation de la voie de signalisation à l'insuline.

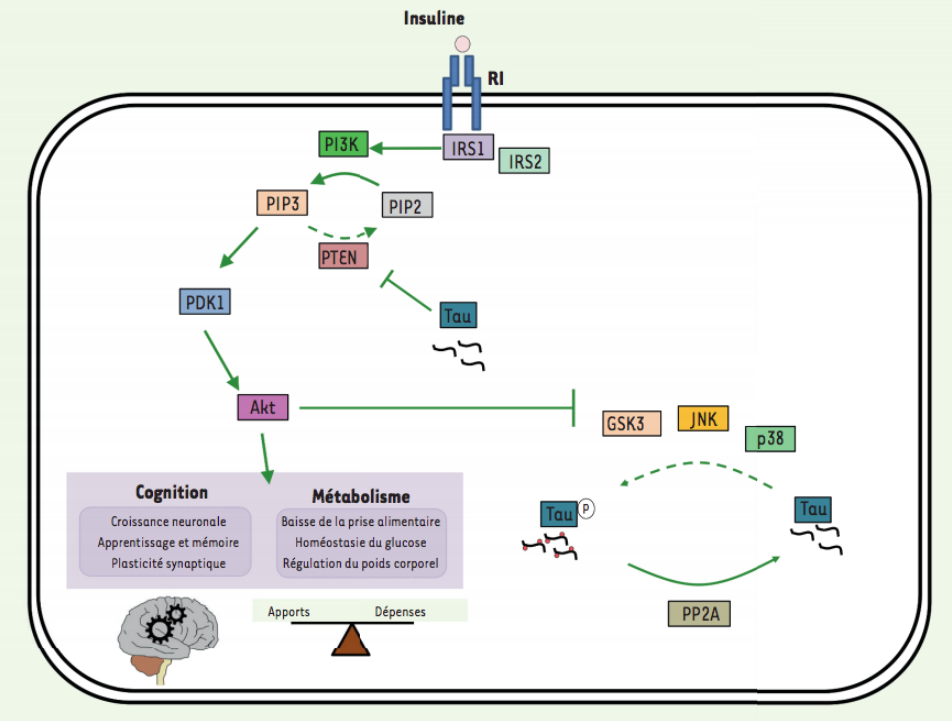

Figure 23 : Relation entre tau et la signalisation de l'insuline.
En condition physiologique, l'insuline permet, *via* Akt, l'inhibition des kinases de tau telles que GSK3β, JNK et p38, ce qui limite l'hyperphosphorylation de tau. Tau peut également se lier à PTEN pour inhiber son activité. Source : (Joly-Amado *et al.*, 2018).

Conclusion

Bien que de nombreuses études épidémiologiques montrent l'obésité comme étant un facteur de risque pour la MA, les études peinent à reproduire les résultats sur des modèles murins et à comprendre les mécanismes sous-jacents. Plus de résultats sont présents pour le DT2 mais ne sont pas plus cohérents ou homogènes et surtout, ils possèdent de nombreuses limites comme l'hypothermie. Il est donc difficile de conclure concernant l'impact de l'obésité sur la MA et d'autres études sont nécessaires pour comprendre le rôle de tau dans la résistance à l'insuline ainsi que les différences fonctionnelles entre la protéine tau murine et la protéine tau humaine.

Il est pourtant important de comprendre l'impact de ces facteurs de risques (l'obésité et le diabète) sur la MA, puisqu'à l'heure actuelle, aucun traitement n'existe contre la MA et le seul moyen de limiter sa propagation est de diminuer les facteurs de risques. De plus, l'insuline semble être un élément important faisant le lien entre ces différentes maladies et pourrait éventuellement servir de traitement, si les mécanismes impliqués sont élucidés. Il est à noter qu'une injection intra-nasale d'insuline semble améliorer la mémoire, sans modifier le métabolisme périphérique, mais il n'y a aucune évidence qu'elle puisse agir directement sur les causes de la MA.

Nous ne savons toujours pas si les changements de l'insuline et de la voie de signalisation à l'insuline dans la maladie d'Alzheimer sont une cause ou une conséquence, malgré le nouveau rôle de tau dans la résistance à l'insuline. Il est difficile de savoir quel phénomène arrive en premier, mais l'augmentation de la phosphorylation de tau pourrait diminuer ses capacités fonctionnelles, dont son rôle dans la voie de signalisation de l'insuline et cette altération conduit à l'augmentation de la phosphorylation de tau *via* la diminution de l'activité de Akt qui ne peut plus inhiber les kinases de tau (Figure 23). Ce cercle vicieux ouvre de nouvelles pistes de recherche, surtout que Aβ semble aussi jouer un rôle sur le récepteur à l'insuline et sur tau.

Enfin, la différence des effets sur le métabolisme entre la protéine tau humaine et murine remet en question l'interprétation des études métaboliques incluant la protéine tau murine.

Étant donné que l'espérance de vie augmente avec la prévalence de la maladie d'Alzheimer et de ses facteurs de risques, il devient crucial de trouver des traitements efficaces et surtout, d'améliorer la communication pour informer la population quant aux facteurs de risques et de préventions.

Bibliographie

(2017). “Dementia”. World Health Organization.

(2018). “World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers.” *Alzheimer’s disease international.*

(2011). “La maladie d’Alzheimer – Le guide”. Poirier, J. and Gauthier, A. Thécarré.

Abolhassani, N.*, et al.* (2017). Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev* **161**(Pt A): 95-104.

Aenlle, K. K.*, et al.* (2009). Estrogen effects on cognition and hippocampal transcription in middle-aged mice. *Neurobiol Aging* **30**(6): 932-945.

Ahmed, T.*, et al.* (2017). Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. *Mol Neurobiol* **54**(4): 2622-2635.

Alonso, A. C.*, et al.* (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* **2**(7): 783-787.

Alzheimer, A.*, et al.* (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **8**(6): 429-431.

Andorfer, C.*, et al.* (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* **25**(22): 5446-5454.

Andorfer, C.*, et al.* (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* **86**(3): 582-590.

Anstey, K. J.*, et al.* (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* **12**(5): e426-437.

Arendt, T.*, et al.* (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* **23**(18): 6972-6981.

Areosa, S. A.*, et al.* (2005). Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD003154.

Arevalo-Rodriguez, I.*, et al.* (2015). Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of Alzheimer's disease and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD010783.

Augustinack, J. C.*, et al.* (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **103**(1): 26-35.

Baglietto-Vargas, D.*, et al.* (2016). Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neurosci Biobehav Rev* **64**: 272-287.

Balin, B. J. and A. P. Hudson (2018). Herpes viruses and Alzheimer's disease: new evidence in the debate. *Lancet Neurol* **17**(10): 839-841.

Bancher, C.*, et al.* (1996). On the relationship between measles virus and Alzheimer neurofibrillary tangles in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurobiol Aging* **17**(4): 527-533.

Banks, W. A.*, et al.* (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther* **136**(1): 82-93.

Barron, A. M.*, et al.* (2013). Sex-specific effects of high fat diet on indices of metabolic syndrome in 3xTg-AD mice: implications for Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**(10): e78554.

Barthel, A. and D. Schmoll (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**(4): E685-692.

Baudier, J. and R. D. Cole (1988). Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **263**(12): 5876-5883.

Baumann, K.*, et al.* (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* **336**(3): 417-424.

Becker, K.*, et al.* (2012). Chronic peripheral hyperinsulinemia has no substantial influence on tau phosphorylation in vivo. *Neurosci Lett* **516**(2): 306-310.

Belleville, S. (2008). Cognitive training for persons with mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr* **20**(1): 57-66.
Benedict, C.*, et al.* (2007). Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology* **86**(2): 136-142.
Bennecib, M.*, et al.* (2001). Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett* **490**(1-2): 15-22.
Beydoun, M. A.*, et al.* (2008). Association of adiposity status and changes in early to mid-adulthood with incidence of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* **168**(10): 1179-1189.
Bhat, N. R. and L. Thirumangalakudi (2013). Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. *J Alzheimers Dis* **36**(4): 781-789.
Biernat, J.*, et al.* (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* **11**(1): 153-163.
Biessels, G. J.*, et al.* (2005). Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1041-1044.
Binder, L. I.*, et al.* (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**(4): 1371-1378.
Bird, T. D. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* **10**(4): 231-239.
Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD005593.
Birks, J. S.*, et al.* (2015). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* **9**: CD001191.
Birks, J. S. and R. J. Harvey (2018). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* **6**: CD001190.
Borchelt, D. R.*, et al.* (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**(4): 939-945.
Bories, C.*, et al.* (2012). Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **7**(9): e46111.
Braak, H. and E. Braak (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**(4): 239-259.
Braak, H.*, et al.* (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**(11): 960-969.
Breitner, J. C.*, et al.* (1994). Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* **44**(2): 227-232.
Bretteville, A. and E. Planel (2008). Tau aggregates: toxic, inert, or protective species? *J Alzheimers Dis* **14**(4): 431-436.
Brion, J. P.*, et al.* (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* **17**(1): 89-96.
Brion, J. P.*, et al.* (1994). Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons. *Neuroscience* **63**(3): 895-909.
Bruning, J. C.*, et al.* (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**(5487): 2122-2125.
Buee, L.*, et al.* (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**(1): 95-130.
Burns, R. G. and C. D. Surridge (1994). Functional role of a consensus peptide which is common to alpha-, beta-, and gamma-tubulin, to actin and centractin, to phytochrome A, and to the TCP1 alpha chaperonin protein. *FEBS Lett* **347**(2-3): 105-111.
Caamano-Isorna, F.*, et al.* (2006). Education and dementia: a meta-analytic study. *Neuroepidemiology* **26**(4): 226-232.
Caceres, A. and K. S. Kosik (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**(6257): 461-463.
Camero, S.*, et al.* (2014). Tau protein provides DNA with thermodynamic and structural features which are similar to those found in histone-DNA complex. *J Alzheimers Dis* **39**(3): 649-660.

Canhada, S.*, et al.* (2018). Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutr Neurosci* **21**(8): 529-538.
Carswell, C. J.*, et al.* (2018). Clinical utility of amyloid PET imaging with (18)F-florbetapir: a retrospective study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **89**(3): 294-299.
Cash, A. D.*, et al.* (2003). Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol* **162**(5): 1623-1627.
Chavez-Gutierrez, L.*, et al.* (2012). The mechanism of gamma-Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J* **31**(10): 2261-2274.
Chen, J.*, et al.* (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**(6405): 674-677.
Chen, Q.*, et al.* (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochem Int* **60**(3): 233-242.
Chen, S.*, et al.* (2008). I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **283**(16): 10513-10521.
Chow, V. W.*, et al.* (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* **12**(1): 1-12.
Citron, M.*, 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**(25): 11993-11997.
Clinton, L. K.*, et al.* (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* **28**(1): 76-82.
Correas, I.*, et al.* (1990). The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* **269**(1): 61-64.
Craft, S.*, et al.* (1998). Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* **50**(1): 164-168.
Cross, D. A.*, et al.* (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**(6559): 785-789.
Cruts, M. and C. Van Broeckhoven (1998). Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* **11**(3): 183-190.
Cunnane, S.*, et al.* (2011). Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* **27**(1): 3-20.
Dawson, H. N.*, et al.* (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* **114**(Pt 6): 1179-1187.
Deane, R.*, et al.* (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* **118**(12): 4002-4013.
Demetrius, L. (2005). Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans. *EMBO Rep* **6 Spec No**: S39-44.
Drewes, G.*, et al.* (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* **11**(6): 2131-2138.
Duff, K.*, et al.* (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* **7**(2): 87-98.
Duff, K. and E. Planel (2005). Untangling memory deficits. *Nat Med* **11**(8): 826-827.
Dutta, S. and P. Sengupta (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* **152**: 244-248.
El Khoury, N. B.*, et al.* (2014). Insulin dysfunction and Tau pathology. *Front Cell Neurosci* **8**: 22.
El Khoury, N. B.*, et al.* (2016). Hypothermia mediates age-dependent increase of tau phosphorylation in db/db mice. *Neurobiol Dis* **88**: 55-65.
Elias, M. F.*, et al.* (2003). Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**(2): 260-268.
Elias, M. F.*, et al.* (2005). Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiol Aging* **26 Suppl 1**: 11-16.
Elie, A.*, et al.* (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci Rep* **5**: 9964.

Engel, T., *et al.* (2006). Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* **99**(6): 1445-1455.
Evans, D. A., *et al.* (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* **262**(18): 2551-2556.
Farr, S. A., *et al.* (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* **149**(5): 2628-2636.
Farrer, L. A., *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**(16): 1349-1356.
Ferri, C. P., *et al.* (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**(9503): 2112-2117.
Festa, A., *et al.* (2006). The natural course of beta-cell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* **55**(4): 1114-1120.
Fiford, C. M., *et al.* (2018). Patterns of progressive atrophy vary with age in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **63**: 22-32.
Forette, F., *et al.* (2002). The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Arch Intern Med* **162**(18): 2046-2052.
Forstl, H. and A. Kurz (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**(6): 288-290.
Fox, N. C., *et al.* (1996). Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet* **348**(9020): 94-97.
French, S. A., *et al.* (2001). Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health* **22**: 309-335.
Frisardi, V., *et al.* (2010). Nutraceutical properties of Mediterranean diet and cognitive decline: possible underlying mechanisms. *J Alzheimers Dis* **22**(3): 715-740.
Frisardi, V., *et al.* (2010). Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **9**(4): 399-417.
Fu, Z., *et al.* (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* **9**(1): 25-53.
Fujio, K., *et al.* (2007). 14-3-3 proteins and protein phosphatases are not reduced in tau-deficient mice. *Neuroreport* **18**(10): 1049-1052.
Fuster-Matanzo, A., *et al.* (2009). Function of tau protein in adult newborn neurons. *FEBS Lett* **583**(18): 3063-3068.
Gao, S., *et al.* (1998). The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* **55**(9): 809-815.
Gatz, M., *et al.* (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* **63**(2): 168-174.
Georgieff, I. S., *et al.* (1993). Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**: 729-737.
Giannakopoulos, P., *et al.* (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60**(9): 1495-1500.
Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**(3): 885-890.
Glenner, G. G., *et al.* (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* **2**(6): 357-369.
Goedert, M. and B. Ghetti (2007). Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol* **17**(1): 57-62.
Goedert, M., *et al.* (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* **409**(1): 57-62.
Goedert, M. and R. Jakes (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* **9**(13): 4225-4230.

Goedert, M.*, et al.* (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**(4): 519-526.
Gong, C. X.*, et al.* (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **65**(2): 732-738.
Gong, C. X.*, et al.* (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **61**(3): 921-927.
Goode, B. L. and S. C. Feinstein (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* **124**(5): 769-782.
Gratuze, M.*, et al.* (2017). Tau hyperphosphorylation in the brain of ob/ob mice is due to hypothermia: Importance of thermoregulation in linking diabetes and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **98**: 1-8.
Gratuze, M.*, et al.* (2018). Mutual Relationship between Tau and Central Insulin Signalling: Consequences for AD and Tauopathies? *Neuroendocrinology* **107**(2): 181-195.
Gratuze, M.*, et al.* (2016). High-fat, high-sugar, and high-cholesterol consumption does not impact tau pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging* **47**: 71-73.
Gratuze, M. and E. Planel (2017). Regulation of brain insulin signaling: A new function for tau. *J Exp Med* **214**(8): 2171-2173.
Gray, S. M.*, et al.* (2014). Insulin regulates brain function, but how does it get there? *Diabetes* **63**(12): 3992-3997.
Greenberg, S. G. and P. Davies (1990). A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 5827-5831.
Grundke-Iqbal, I.*, et al.* (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(13): 4913-4917.
Gunstad, J.*, et al.* (2010). Longitudinal examination of obesity and cognitive function: results from the Baltimore longitudinal study of aging. *Neuroepidemiology* **34**(4): 222-229.
Guo, T.*, et al.* (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* **133**(5): 665-704.
Guyant-Marechal, L.*, et al.* (2009). [Alzheimer disease: autosomal dominant forms]. *Rev Neurol (Paris)* **165**(3): 223-231.
Haass, C.*, et al.* (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(5): a006270.
Hampel, H.*, et al.* (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **141**(7): 1917-1933.
Hanger, D. P.*, et al.* (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* **15**(3): 112-119.
Harada, A.*, et al.* (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**(6480): 488-491.
Harvey, R. J.*, et al.* (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**(9): 1206-1209.
Hasegawa, M. (2006). Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology* **26**(5): 484-490.
Hasegawa, M.*, et al.* (1996). Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* **384**(1): 25-30.
Hebert, L. E.*, et al.* (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **80**(19): 1778-1783.
Hersi, M.*, et al.* (2017). Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. *Neurotoxicology* **61**: 143-187.
Hirata-Fukae, C.*, et al.* (2008). Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res* **1216**: 92-103.
Hoglinger, G. U.*, et al.* (2018). New classification of tauopathies. *Rev Neurol (Paris)* **174**(9): 664-668.
Hong, M.*, et al.* (1997). Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* **272**(40): 25326-25332.
Hopkins, D. F. and G. Williams (1997). Insulin receptors are widely distributed in human brain and bind human and porcine insulin with equal affinity. *Diabet Med* **14**(12): 1044-1050.

Hu, F. B. (2011). Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care* **34**(6): 1249-1257.
Ikeda, H.*, et al.* (1986). Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite* **7**(4): 381-386.
Iqbal, K.*, et al.* (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* **118**(1): 53-69.
Ishiguro, K.*, 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**(3): 167-172.
Jagust, W.*, et al.* (2005). Central obesity and the aging brain. *Arch Neurol* **62**(10): 1545-1548.
Jankowsky, J. L.*, et al.* (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* **13**(2): 159-170.
Jarrett, J. T.*, et al.* (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **695**: 144-148.
Jeon, B. T.*, et al.* (2012). Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **61**(6): 1444-1454.
Jolivalt, C. G.*, et al.* (2008). Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res* **86**(15): 3265-3274.
Joly-Amado, A.*, et al.* (2018). [Brain insulin signaling and Tau: impact for Alzheimer's disease and Tauopathies]. *Med Sci (Paris)* **34**(11): 929-935.
Julien, C.*, et al.* (2012). Biochemical isolation of insoluble tau in transgenic mouse models of tauopathies. *Methods Mol Biol* **849**: 473-491.
Julien, C.*, et al.* (2010). High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging* **31**(9): 1516-1531.
Katzman, R. (1993). Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology* **43**(1): 13-20.
Khoury, R.*, et al.* (2018). An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther Adv Drug Saf* **9**(3): 171-178.
Kim, B.*, et al.* (2013). Hyperglycemia-induced tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **34**(3): 727-739.
Kim, B.*, et al.* (2009). Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* **150**(12): 5294-5301.
Kim, B.*, et al.* (2015). Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPKSer-485 Phosphorylation. *J Biol Chem* **290**(31): 19146-19157.
Kim, J.*, et al.* (2007). Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo. *J Neurosci* **27**(3): 627-633.
Kimura, T.*, et al.* (1996). Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* **7**(4): 177-181.
Kimura, T.*, et al.* (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**(1633): 20130144.
Kins, S.*, et al.* (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol* **163**(3): 833-843.
Kivipelto, M.*, et al.* (2005). Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol* **62**(10): 1556-1560.
Knight, E. M.*, et al.* (2014). High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging* **35**(8): 1821-1832.
Koga, S.*, et al.* (2014). Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a tauopathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression. *Neurobiol Dis* **71**: 180-192.
Kosik, K. S.*, et al.* (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* **2**(4): 1389-1397.

Kothari, V., *et al.* (2017). High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**(2): 499-508.
Kovacs, G. G. (2017). Tauopathies. *Handb Clin Neurol* **145**: 355-368.
Ksiezak-Reding, H., *et al.* (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* **597**(2): 209-219.
Ksiezak-Reding, H., *et al.* (2003). Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1639**(3): 159-168.
Kyrou, I., *et al.* (2000). Clinical Problems Caused by Obesity. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyceet al. South Dartmouth (MA).
La, A. L., *et al.* (2019). Long-Term Trazodone Use and Cognition: A Potential Therapeutic Role for Slow-Wave Sleep Enhancers. *J Alzheimers Dis* **67**(3): 911-921.
Larson, E. B., *et al.* (2006). Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med* **144**(2): 73-81.
Leboucher, A., *et al.* (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on tau pathology are independent of insulin resistance in tau transgenic mice. *Diabetes* **62**(5): 1681-1688.
Ledesma, M. D., *et al.* (1995). Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem* **65**(4): 1658-1664.
Leduc, V., *et al.* (2010). APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* **16**(10): 469-477.
Lee, Y. I., *et al.* (2005). Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/dephosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta, and this dephosphorylation involves protein phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **280**(23): 22044-22052.
Leroy, K., *et al.* (2007). Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**(1): 43-55.
Li, J., *et al.* (2017). Effects of Diabetes Mellitus on Cognitive Decline in Patients with Alzheimer Disease: A Systematic Review. *Can J Diabetes* **41**(1): 114-119.
Li, Y. M., *et al.* (2000). Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6138-6143.
Liu, F., *et al.* (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* **22**(8): 1942-1950.
Lovheim, H., *et al.* (2019). Herpes Simplex Virus, APOEvarepsilon4, and Cognitive Decline in Old Age: Results from the Betula Cohort Study. *J Alzheimers Dis* **67**(1): 211-220.
Lucas, J. J., *et al.* (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* **20**(1-2): 27-39.
Luchsinger, J. A. and R. Mayeux (2004). Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep* **6**(4): 261-266.
Luchsinger, J. A., *et al.* (2005). Aggregation of vascular risk factors and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* **65**(4): 545-551.
Luchsinger, J. A., *et al.* (2002). Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* **59**(8): 1258-1263.
Luchsinger, J. A., *et al.* (2004). Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* **63**(7): 1187-1192.
Ma, J., *et al.* (2016). Peripheral Blood Adipokines and Insulin Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Replication Study and Meta-Analysis. *Curr Alzheimer Res* **13**(3): 223-233.
Ma, Q. L., *et al.* (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci* **29**(28): 9078-9089.
Maas, T., *et al.* (2000). Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* **275**(21): 15733-15740.
Madan, C. R. and E. A. Kensinger (2016). Cortical complexity as a measure of age-related brain atrophy. *Neuroimage* **134**: 617-629.
Magnani, E., *et al.* (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* **26**(21): 4546-4554.

Mandelkow, E. M., *et al.* (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* **24**(8): 1079-1085.
Marciniak, E., *et al.* (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J Exp Med* **214**(8): 2257-2269.
Martin, L., *et al.* (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **58**(4): 458-471.
Martin, M., *et al.* (1999). Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell* **10**(11): 3717-3728.
Maurer, K., *et al.* (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **349**(9064): 1546-1549.
Mayer, J. P., *et al.* (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers* **88**(5): 687-713.
McKhann, G., *et al.* (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**(7): 939-944.
Morishima-Kawashima, M., *et al.* (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* **16**(3): 365-371; discussion 371-380.
Morris, M., *et al.* (2011). The many faces of tau. *Neuron* **70**(3): 410-426.
Mosconi, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**(4): 486-510.
Mrak, R. E. (2009). Alzheimer-type neuropathological changes in morbidly obese elderly individuals. *Clin Neuropathol* **28**(1): 40-45.
Mukrasch, M. D., *et al.* (2007). The "jaws" of the tau-microtubule interaction. *J Biol Chem* **282**(16): 12230-12239.
Muller, R., *et al.* (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res* **288**(2): 239-249.
Nasreddine, Z. S., *et al.* (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* **53**(4): 695-699.
Neve, R. L., *et al.* (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* **387**(3): 271-280.
Obici, S., *et al.* (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* **5**(6): 566-572.
Oddo, S., *et al.* (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **24**(8): 1063-1070.
Oddo, S., *et al.* (2006). Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* **281**(51): 39413-39423.
Okamura, N., *et al.* (2018). The development and validation of tau PET tracers: current status and future directions. *Clin Transl Imaging* **6**(4): 305-316.
Olsson, B., *et al.* (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **15**(7): 673-684.
Ott, A., *et al.* (1996). Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* **39**(11): 1392-1397.
Otvos, L., Jr., *et al.* (1994). Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* **39**(6): 669-673.
Pallas-Bazarra, N., *et al.* (2016). Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J* **35**(13): 1417-1436.
Palta, P., *et al.* (2017). Diabetes and Cognitive Decline in Older Adults: The Ginkgo Evaluation of Memory Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **73**(1): 123-130.
Papasozomenos, S. C. and L. I. Binder (1987). Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton* **8**(3): 210-226.
Pasinetti, G. M. and J. A. Eberstein (2008). Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **106**(4): 1503-1514.

Petrov, D.*, et al.* (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiences contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta* **1852**(9): 1687-1699.
Petrovitch, H.*, et al.* (2000). Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiol Aging* **21**(1): 57-62.
Petry, F. R.*, et al.* (2014). Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS One* **9**(5): e94251.
Pettersson, U. S.*, et al.* (2012). Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS One* **7**(9): e46057.
Pini, L.*, et al.* (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev* **30**: 25-48.
Planel, E.*, et al.* (2004). Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* **24**(10): 2401-2411.
Planel, E.*, et al.* (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* **27**(12): 3090-3097.
Planel, E.*, et al.* (2007). Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci* **27**(50): 13635-13648.
Plum, L.*, et al.* (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* **16**(2): 59-65.
Poirier, J.*, et al.* (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**(8873): 697-699.
Polydoro, M.*, et al.* (2009). Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci* **29**(34): 10741-10749.
Pooler, A. M. and D. P. Hanger (2010). Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. *Biochem Soc Trans* **38**(4): 1012-1015.
Profenno, L. A.*, et al.* (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* **67**(6): 505-512.
Qian, W. and F. Liu (2014). Regulation of alternative splicing of tau exon 10. *Neurosci Bull* **30**(2): 367-377.
Qu, Z.*, et al.* (2011). Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res* **1383**: 300-306.
Ramos-Rodriguez, J. J.*, et al.* (2013). Differential central pathology and cognitive impairment in pre-diabetic and diabetic mice. *Psychoneuroendocrinology* **38**(11): 2462-2475.
Reiman, E. M.*, et al.* (2004). Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 284-289.
Reisberg, B., S. H. Ferris, R. Anand et all (1984). Functional staging of dementia of the Alzheimer type. *Annals of the New York Academy of Sciences* **435**(1): 481-483.
Reitz, C. and R. Mayeux (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* **88**(4): 640-651.
Reynolds, M. R.*, et al.* (2006). Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J Neurosci* **26**(42): 10636-10645.
Rivera, E. J.*, et al.* (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* **8**(3): 247-268.
Rogawski, M. A. and G. L. Wenk (2003). The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* **9**(3): 275-308.
Rossi, G.*, et al.* (2013). Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome. *J Alzheimers Dis* **33**(4): 969-982.
Saito, T.*, et al.* (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **17**(5): 661-663.
Salas, I. H.*, et al.* (2018). High fat diet treatment impairs hippocampal long-term potentiation without alterations of the core neuropathological features of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* **113**: 82-96.
Saltiel, A. R. and J. E. Pessin (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* **12**(2): 65-71.

Schindowski, K., *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**(2): 599-616.
Selkoe, D. J. (2000). Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* **924**: 17-25.
Selkoe, D. J. and J. Hardy (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**(6): 595-608.
Sellbom, K. S. and J. Gunstad (2012). Cognitive function and decline in obesity. *J Alzheimers Dis* **30 Suppl 2**: S89-95.
Seshadri, S., *et al.* (1997). Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology* **49**(6): 1498-1504.
Shin, J. Y., *et al.* (2013). Risk of ischemic stroke with the use of risperidone, quetiapine and olanzapine in elderly patients: a population-based, case-crossover study. *J Psychopharmacol* **27**(7): 638-644.
Shuai, H., *et al.* (2012). Role of stereotaxically injected IgG from db/db mice in the phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in hippocampus. *Brain Res* **1486**: 14-26.
Simpson, I. A., *et al.* (1994). Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **35**(5): 546-551.
Simpson, J. E., *et al.* (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* **31**(4): 578-590.
Sparks, D. L., *et al.* (2005). Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol* **62**(5): 753-757.
Stampfer, M. J. (2006). Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J Intern Med* **260**(3): 211-223.
Stanley, M., *et al.* (2016). Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer's disease: cause or consequence? *J Exp Med* **213**(8): 1375-1385.
Steen, E., *et al.* (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* **7**(1): 63-80.
Sultan, A., *et al.* (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* **286**(6): 4566-4575.
Sutherland, C., *et al.* (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* **296 (Pt 1)**: 15-19.
Suzuki, N., *et al.* (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**(5163): 1336-1340.
Sydow, A., *et al.* (2011). Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci* **31**(7): 2511-2525.
Takalo, M., *et al.* (2014). High-fat diet increases tau expression in the brain of T2DM and AD mice independently of peripheral metabolic status. *J Nutr Biochem* **25**(6): 634-641.
Tashiro, K., *et al.* (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* **8**(12): 2797-2801.
Tennagels, N. and U. Werner (2013). The metabolic and mitogenic properties of basal insulin analogues. *Arch Physiol Biochem* **119**(1): 1-14.
Thal, D. R., *et al.* (2015). Neuropathology and biochemistry of Abeta and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **129**(2): 167-182.
Theendakara, V., *et al.* (2018). Transcriptional Effects of ApoE4: Relevance to Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* **55**(6): 5243-5254.
Thurston, V. C., *et al.* (1996). Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* **105**(1): 20-30.
Tokuda, T., *et al.* (1991). Re-examination of ex-boxers' brains using immunohistochemistry with antibodies to amyloid beta-protein and tau protein. *Acta Neuropathol* **82**(4): 280-285.
Tolppanen, A. M., *et al.* (2016). Antipsychotic Use and Risk of Hospitalization or Death Due to Pneumonia in Persons With and Those Without Alzheimer Disease. *Chest* **150**(6): 1233-1241.

Torrent, L. and I. Ferrer (2012). PP2A and Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* **9**(2): 248-256.
Tucker, K. L.*, et al.* (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* **4**(1): 29-37.
Valenzuela, M. J. and P. Sachdev (2006). Brain reserve and dementia: a systematic review. *Psychol Med* **36**(4): 441-454.
Van Cauwenberghe, C.*, et al.* (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med* **18**(5): 421-430.
Vandal, M.*, et al.* (2014). Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain Abeta and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes* **63**(12): 4291-4301.
Vemuri, P. and C. R. Jack, Jr. (2010). Role of structural MRI in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **2**(4): 23.
Verhey, F. R. (2009). Alois Alzheimer (1864-1915). *J Neurol* **256**(3): 502-503.
Walker, J. M.*, et al.* (2017). Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, beta-amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **100**: 87-98.
Walsh, D. M.*, et al.* (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**(6880): 535-539.
Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44**(1): 181-193.
Wang, J.*, et al.* (2015). Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* **44**(2): 385-396.
Wang, J. Z.*, et al.* (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* **25**(1): 59-68.
Wang, J. Z.*, et al.* (1998). Tau is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in Alzheimer disease and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Lett* **436**(1): 28-34.
Wang, Y. and E. Mandelkow (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* **17**(1): 5-21.
Watson, G. S. and S. Craft (2004). Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **490**(1-3): 97-113.
Weaver, C. L.*, et al.* (2000). Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**(5): 719-727.
Wei, Y.*, et al.* (2008). Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* **3**(7): e2600.
Wilkins, H. M. and R. H. Swerdlow (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* **133**: 71-79.
Willis, S. L.*, et al.* (2006). Long-term effects of cognitive training on everyday functional outcomes in older adults. *JAMA* **296**(23): 2805-2814.
Wilmoth, J. R. (2000). Demography of longevity: past, present, and future trends. *Exp Gerontol* **35**(9-10): 1111-1129.
Witman, G. B.*, et al.* (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(11): 4070-4074.
Woods, S. C.*, et al.* (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**(5738): 503-505.
Yao, X. Q.*, et al.* (2011). Glycogen synthase kinase-3beta regulates Tyr307 phosphorylation of protein phosphatase-2A via protein tyrosine phosphatase 1B but not Src. *Biochem J* **437**(2): 335-344.
Yasar, S.*, et al.* (2013). Antihypertensive drugs decrease risk of Alzheimer disease: Ginkgo Evaluation of Memory Study. *Neurology* **81**(10): 896-903.
Yoshiyama, Y.*, et al.* (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* **53**(3): 337-351.
Zilka, N.*, et al.* (2006). Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett* **580**(15): 3582-3588.

Annexe

Annexe A : Composition des diètes

Informations nutrionnelles sélectionnées				
	Diète purifiée		Régime calorique ajusté (60%)	
Teklad Custom Diet	TD.97184		TD.06414	
	% par poids	% kcal de	% par poids	% kcal de
Protéines	17.7	18.8	23.5	18.3
Glucides	60.1	63.9	27.3	21.4
Lipides	7.2	17.2	34.3	60.3
Kcal/g	3.8		5.1	
Formule				
	g/Kg		g/Kg	
Caséine	200		265	
L-Cystine	3		4	
Fécule de maïs	392.234		160	
Maltodextrine	132		90	
Saccharose	100		310	
Huile de soja	70		30	
Cellulose	50		65.5	
Mélange de minéraux, AIN-93G-MX	35		48	
Mélange de vitamines, AIN-93-VX	15		3.4	
Bitartrate de choline	2.75		21	
Vitamine K1	0.002		3	
TBHQ, antioxydant	0.014		0.1	
Notes			37% saturé; 47% mono-insaturé; 16 poly-insaturé	

Annexe 1. Composition de la diète contrôle (CTL) : diète purifiée et de la diète riche en gras (HFD) : régime calorique ajusté (60%).

Annexe B : Liste des anticorps utilisés.

Antibody	Epitope	Supplier (catalog #)	dilution
Tau phosphorylation			
AT8	pSer202-pThr205	Fisher (MN1020)	1/1000
CP13	pSer202	Peter Davis	1/1000
pS422	Ser422	Abcam (ab79415)	1/1000
Tau-1	depSer195/198/199/202	Millipore (MAB3420)	1/1000
PHF-1	pSer396/pSer404	Peter Davis	1/1000
pT205	Thr205	Invitrogen (44738G)	1/1000
pS199	Ser199	Invitrogen (44734G)	1/1000
Total Tau			
CP27	Tau 130-150 (humain)	Peter Davis	1/1000
TauC	aa 243-441 (c-term)	Dako (A0024)	1/2000
Kinases			
pPI3K	p85(Y458)/p55(Y199)	Cell Signalling (4228S)	1/1000
PI3K	p85(19H8)	Cell Signalling (4257S)	1/1000
pGSK-3β	S9	Cell Signalling (9336S)	1/1000
GSK-3β	aa 1-160	BD biosciences (610202)	1/1000
Phosphatases			
PP2AC methyl	methylated C subunit	Millipore (04-1479)	1/1000
PP2AC demethyl	unmethylated C subunit	Santa Cruz (sc-13601)	1/1000
PP2AC	C subunit	Cell Signalling (2038S)	1/1000
Insulin signaling			
p-IR	receptor β - Y1345	Cell Signalling (3026S)	1/1000
IR	receptor β	Santa Cruz (sc-711)	1/1000
pAkt	S473	Cell Signalling (9271S)	1/1000
Akt	Akt1, Akt2, Akt3	Cell Signalling (9272S)	1/1000
Control			
β-Actin	β-actin clone AC-74	Sigma Aldrich	1/10000
Secondary antibodies			
goat anti-rabbit	Rabbit IgG	Jackson immunoresearch (111035144)	1/5000
goat anti-mouse	Mouse IgG	Jackson immunoresearch (115035003)	1/5000
goat anti-mouse LC	primary antibodies LC	Millipore	1/5000

Annexe 2: List of antibodies used.