THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé spécialité Neurosciences

École doctorale CBS2 (Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé)

Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle

Implication de nouvelles cibles microgliales, *Cst7* et *Clec7a*, dans le développement et la progression de la maladie d'Alzheimer

Présentée par Anne-Laure HEMONNOT-GIRARD

Le 06 Mai 2021

Sous la direction de Hélène HIRBEC

Devant le jury composé de

[Dr. Florence Perrin, Professeure, MMDN, Montpellier]	[Présidente de jury]
[Dr. Carole Escartin, Chargée de Recherche, MIRCen, Paris]	[Rapportrice]
[Dr. Pierre Gressens, Directeur de Recherche, Université Paris 7, Paris]	[Rapporteur]
[Dr. Guillaume Dorothée, Chargé de Recherche, CRSA, Paris]	[Examinateur]
[Dr. David Blum, Directeur de Recherche, LiCEND, Lille]	[Examinateur]
[Dr. Hélène Hirbec, Chargée de Recherche, IGF, Montpellier]	[Directrice de Thèse]

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

À toi, celui qui donne un sens à ma vie.

Remerciements

J'aimerais commencer par remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté, malgré les nombreuses contraintes, de lire et juger mes travaux. Plus particulièrement, merci à Florence et Guillaume pour avoir aussi participé à mes comités de suivi, d'avoir apporté un oeil extérieur au projet et surtout un soutiens lors des moments difficiles.

Merci Hélène pour m'avoir tout appris. Merci pour toutes ces fois où tu as essayé de me donner la passion du single-cell, même si j'avoue que je n'ai toujours pas très bien compris ! Merci pour toutes les explications de stats, j'espère que je vais m'en sortir maintenant. Merci d'avoir su me manager (je sais c'était pas facile), d'avoir accepté mes "TOC"s et mon mauvais caractère. Merci de m'avoir appris à réfléchir et d'avoir fait de moi la scientifique que je suis aujourd'hui.

Merci à tous les membres de l'équipe pour m'avoir accueilli. Merci à François pour m'avoir accepté dans son équipe et d'avoir bien voulu me garder un an de plus. Merci à Vincent pour les discussions de biochimie, l'aide pour les western et le stress de me recevoir une ampoule en pleine tête à tout instant. Merci à Jennifer pour toutes les soirées chips au labo et les "j'ai faim" à partir de 20h, pour avoir été aussi folle que moi à t'imaginer les solutions dans les tubes et autre. Merci à Sandra pour les discussions sur le pouvoir de dire non, les conseils bébé et les moments partagés. Merci à Valentin pour ton aide dans les projets, pour ton chant et ta joie de vivre.

Merci à Mamina, pour les conseils de manips, pour avoir téléphoné à ma place pour les commandes, pour m'aider à fermer les centris, pour le soutiens tout au long de ces années. On n'oublie pas les heures de déjeuner à faire des origamis, les loisirs créatifs pour le mariage et tous les conseils de vie. Tu as su être une amie, une soeur et une mère parfois. Sans toi ça n'aurait pas été pareil.

Un grand merci aux services communs de l'IGF, les animaleries iExplore et le CECEMA, la plateforme MRI et surtout Marie-Pierre pour tous les brainstormings pour mes problèmes de marquage.

Merci à tous nos collaborateurs qui ont participé à ce projet, Dr Torrent, Dr Maurice, Dr Verdonk, Dr Janneteau, sans qui l'histoire ne serait pas aussi complète. Merci à nos

sponsors, le LabeX ICST, Vaincre Alzheimer, la Fondation pour Alzheimer qui m'ont permis de travailler. Merci aux patients et leurs familles, pour avoir donné leurs cerveaux à la science, contribuant chaque jour à améliorer nos connaissances.

Merci à toute la bande de l'IGF et celle d'Ubi aussi. Merci pour les pauses cafés, les déjeuner, les tarots et les instants chansons, ces beach-volley à s'éclater les veines l'été, ces soirées jeux endiablées et tous les moments partagés.

Merci à Alyssa et Yasmine pour m'avoir supportée pour le mariage. Pour tous les déjeuners et pause cafés et surtout d'avoir été là sur la fin de thèse qui est restée difficile même dopée aux hormones.

Merci à celui qui a partagé toutes ces années de folie avec moi. Qui a essayé de comprendre. Même si pour toi on parle en langage codé, je t'assure nos acronymes ont un sens. Merci d'avoir imposé un cadre pour éviter que je me noie dans le travail. Merci pour les soirées à rigoler, les week-ends en balades et tous ces merveilleux voyages. Merci d'avoir été là quand ça n'allait pas et d'avoir su prendre soin de moi. Sans toi, je ne serais pas arrivée au bout, cette thèse c'est aussi un peu la tienne.

Merci à notre petit soleil pour apporter tant de bonheur dans nos vies.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Acronymes

1 Introduction **1**

A La microglie . . . 3

A.1 Un couteau Suisse aux nombreux rôles physiologiques . . . 4

A.1.i Un acteur crucial du neurodéveloppement . . . 4

A.1.ii Des cellules de soutien pour le maintien de l'homéostasie 5

A.2 L'hétérogénéité microgliale . . . 6

A.2.i La localisation microgliale, un facteur souvent oublié . . 6

A.2.ii L'effet du sexe sur les fonctions microgliales n'est pas à négliger . . . 7

A.2.iii Impact dans le vieillissement . . . 8

A.2.iv Hétérogénéité entre les espèces . . . 9

A.3 La réaction microgliale... . . . 9

A.3.i ... est schématiquement stéréotypée 10

A.3.ii ... mais en réalité polymorphique . . . 11

A.4 La neuroinflammation dans les pathologies du SNC . . . 12

B La maladie d'Alzheimer . . . 15

B.1 Prévalence et incidence . . . 15

B.2 Caractéristiques pathologiques . . . 16

B.3 Pourquoi la MA se développe t-elle ? . . . 17

B.3.i L'amyloïde-β au coeur de la pathologie . . . 17

B.3.ii La protéine Tau responsable de la neurodégénérescence 19

B.3.iii Aβ et Tau agissent ensemble . . . 20

B.3.iv La Neuroinflammation, une autre caractéristique clef de la MA . . . 20

B.4 Diagnostic et Traitements . . . 22

B.4.i Les biomarqueurs actuellement utilisés . . . 23

B.4.ii Essais thérapeutiques, des échecs et de l'espoir . . . 25

B.5 Modèles d'étude de la MA . . . 27

B.5.i Les modèles animaux . . . 27

B.5.ii Les modèles plus proches de l'Homme 33
B.6 Les enjeux du stade précoce 34
C Les Microglies dans la maladie d'Alzheimer 36
C.1 Les facteurs de risques génétiques microgliaux de la MA 36
C.1.i Identification des facteurs de risques génétiques 36
C.1.ii Des cibles microgliales sous les feux des projecteurs . . 36
C.2 Les microglies au stade précoce de la MA 39
C.3 Fonctions microgliales impliquées dans le développement de la MA 40
C.3.i La microglie répond à l'Aβ 40
C.3.ii Élimination des synapses/neurones Tau positifs 42
C.3.iii La réaction microgliale, positive ou délétère ? 42
C.4 L'hétérogénéité microgliale dans la MA 43
C.4.i Hétérogénéité morphologique 44
C.4.ii Hétérogénéité transcriptomique 44
D Résultats préliminaires et hypothèses de travail 49
D.1 La diversité microgliale est dépendante de sa localisation et du stade de la MA 49
D.2 Validation des cibles microgliales au stade tardif 51
D.3 Au stade prodromal, le transcriptome des microglies est déjà dérégulé 54
E Cystatine-F et Dectin-1, deux cibles d'intérêt 55
E.1 La Cystatine-F 55
E.1.i Caractéristiques générales 55
E.1.ii Cystatine-F dans les microglies, expression et fonctions 58
E.1.iii Une cible intéressante dans la MA 59
E.2 Le récepteur Dectin-1 61
E.2.i Structure 61
E.2.ii Ligands, Adressage et Expression à la périphérie 61
E.2.iii Voies de signalisations 63
E.2.iv Fonctions à la périphérie 65
E.2.v Expression et Fonctions dans le SNC 66
E.2.vi Implication dans la MA 67
F Des nouvelles cibles de la MA, problématiques de travail 69

2 Matériels et Méthodes **71**
A Échantillons humains 73
B Modèles animaux 73
B.1 APP^{swe}/PS1^{dE9} 73
B.2 APP^{swe}/PS1^{dE9}.CX$_3$CR$_1^{+/eGFP}$ 74
B.3 APP^{NL-F} 74
B.4 J20 74
B.5 5xFAD 75

B.6 Génotypage 75
C Études Comportementales 75
C.1 Champ ouvert ou Openfield 75
C.2 Labyrinthe de Barnes 76
C.3 Hamlet 77
D Marquages Histologiques et Immunohistochimiques 78
D.1 Préparation des tissus 78
D.2 Inclusion et coupe 78
D.3 Marquage des plaques amyloïdes 79
D.4 Immunofluorescence 79
D.5 RNAScope 79
D.6 Microscopie 80
D.7 Quantification 81
E Biologie cellulaire 81
E.1 Culture de BV-2 81
E.2 Lignées stables modifiées de BV-2 (lignées Knock-Down ou KD) 81
E.3 Conditionnement au LPS 82
E.4 Phagocytose 82
E.5 Lysosensor, analyse du pH des organelles intracellulaires 83
F Analyses Biochimiques 84
F.1 Mesure de la concentration en IL-1 85
F.2 Préparation de synaptosomes 85
F.3 Western Blot 85
F.4 ELISA MSD® 86
G Analyses transcriptomiques 87
G.1 Extraction d'ARN 87
G.2 qPCR 88
H Statistiques 88

3 Résultats **91**
A Caractérisation du modèle APP/PS1 au stade précoce 96
A.1 De multiples défauts comportementaux 96
A.2 Amyloïdose et réaction gliale chez les APP/PS1 à 4 mois 99
A.2.i Amyloïde β 100
A.2.ii Une microgliose fine et précoce 103
A.2.iii Absence de réactivité astrocytaire 106
A.2.iv Un état neuroinflammatoire intact 106
A.3 Une désorganisation synaptique complexe 106
A.4 4 mois, un âge charnière chez les femelles APP/PS1 107
B *Cst7* et *Clec7a*/Dectin-1 au stade précoce : où, quand et pourquoi ? . . 109
B.1 La sur-expression des cibles apparaît dès 4 mois et reflète la progression de la MA 109

B.2 Des cibles communes à divers modèles murins de la MA 110
B.3 La sur-expression microgliale dépend de la localisation 113
B.3.i L'expression de *Cst7* est induite à proximité des dépôts amyloïdes mais pas seulement 113
B.3.ii L'expression de *Clec7a* semble dépendante des plaques . 115
B.4 Des sous-types différents de microglies 116
B.5 Corrélation avec la pathologie amyloïde 117
B.6 Sur-expression de Dectin-1 118
C Étude des rôles fonctionnels microgliaux de *Cst7* et *Clec7a* 120
C.1 Impact des cibles sur le statut inflammatoire basal 120
C.1.i Analyse transcriptomique à moyen débit 121
C.1.ii Concentration en IL-1 121
C.2 Impact des cibles sur la capacité de réponse à un challenge inflammatoire 123
C.2.i Analyse transcriptomique à moyen débit 123
C.2.ii Concentration en IL-1 123
C.3 Phagocytose 124
C.4 Fonction lysosomale 125
D Implication des cibles dans la pathologie chez l'Homme 126

4 Discussion **129**
A L'amyloïdose, un processus clef dans les modèles murins de la MA . . . 131
A.1 4 mois, le point de départ de l'amyloïdose 131
A.2 Des défauts comportementaux précoces 132
A.3 Les défauts synaptiques 133
A.4 La réaction gliale 134
A.4.i L'état inflammatoire global précoce 135
A.4.ii La réaction astrocytaire 135
A.4.iii Une réaction microgliale précoce et complexe 136
A.5 Des pistes pour compléter la caractérisation du stade précoce . . 137
A.5.i L'effet du sexe 137
A.5.ii Valider la spécificité microgliale 138
A.5.iii L'état de la barrière hématoencéphalique 138
B *Cst7* et *Clec7a*, des cibles au stade précoce 139
B.1 Des candidats intéressants chez l'Homme 139
B.2 Les deux cibles sont surexprimées dans les microglies et au cours de la progression de la pathologie 140
B.3 L'adressage de Dectin-1 142
B.4 Les rôles fonctionnels complexes de *Cst7* et *Clec7a* 143
B.4.i *Clec7a*, des rôles positifs ou délétères ? 143
B.4.ii Les rôles de *Cst7* restent à déterminer 145
B.4.iii Un effet synergique entre les deux cibles ? 145

B.5 Perspectives pour l'étude fonctionnelle des cibles 146
B.5.i Vers un modèle plus physiopathologique 146
B.5.ii Un modèle *in-vitro* à affiner 146
C Les fondations pour un nouveau projet de recherche 147

5 Conclusion **151**

Bibliographie **155**

Annexe A Publication 1 **195**

Annexe B Publication 2 **217**

Annexe C Liste de mes publications **233**

Annexe D Liste de mes présentations **237**

Abstracts

Liste des figures

1.1 Microglies homéostatiques : un petit corps cellulaire et de longs prolongements . . . 3
1.2 L'hétérogénéité microgliale physiologique est dépendante de la région cérébrale . . . 7
1.3 Représentation de la diversité de la réaction microgliale . . . 12
1.4 Caractéristiques histopathologiques de la MA chez l'Homme . . . 17
1.5 Voies de dégradation de l'APP . . . 18
1.6 Schématisation des voies d'agrégation amyloïde . . . 19
1.7 Biomarqueurs de la MA . . . 24
1.8 Cinétique d'apparition des principales caractéristiques de la MA dans le modèle $APP^{swe}/PS1^{dE9}$ . . . 29
1.9 Mutations sur la séquence protéique de l'APP afin de créer le modèle APP^{NL-F} . . . 30
1.10 Analyse bibliographique du développement des symptômes de la MA dans le modèle $APP^{NL-F/NL-F}$ . . . 31
1.11 Facteurs de risques génétiques de la MA et leur spécificité d'expression microgliale . . . 37
1.12 Cinétique d'apparition des caractéristiques de la MA . . . 40
1.13 Morphologie des microglies associées aux plaques et des microglies distantes des plaques dans le modèle TgCRND8 de la MA . . . 44
1.14 Remodelage du transcriptome des microglies selon leur localisation et la progression de la MA . . . 50
1.15 Sur-expression microgliale de *Clec7a* et *Cst7* à 8 mois . . . 52
1.16 Sur-expression microgliale de Dectin-1 à 12 mois . . . 53
1.17 Remodelage transcriptomique des microglies dans le parenchyme au stade précoce de 4 mois . . . 54
1.18 Cystatine-F, famille et structure . . . 56
1.19 Fonctions de la Cystatine-F à la périphérie . . . 58
1.20 Structure du récepteur Dectin-1 . . . 62
1.21 Schématisation des voies de signalisation du complexe Dectin-1/SYK . . . 64
1.22 Schématisation des voies de signalisation de Dectin-1 indépendantes de la protéine SYK . . . 65

2.1 Schématisation de la mise en place de la MA dans le modèle J20 74
2.2 Schématisation de la mise en place de la MA dans le modèle 5xFAD . . 75
2.3 Schématisation du protocole du Barnes Maze 77
2.4 Schématisation du protocole du Hamlet 78
2.5 Efficacité des shRNA exprimés dans les BV-2 83
2.6 Caractéristiques des fluorescences du lysosenseur utilisé 84

3.1 À 4 mois, les femelles APP/PS1 montrent une hyperlocomotion mais pas d'anxiété 97
3.2 Déficits d'apprentissage et de mémoire chez les souris APP/PS1 98
3.3 Densité des plaques amyloïdes dans le cortex à 4 mois 100
3.4 Cinétique d'apparition des espèces d'Aβ dans les fractions triton- et guanidine-solubles 101
3.5 Le niveau d'expression des enzymes de dégradation d'Aβ est inchangé à 4 mois 102
3.6 Absence d'hyperplasie microgliale à 4 mois 104
3.7 À 4 mois, les modifications morphologiques sont subtiles et dépendantes de la région cérébrale 105
3.8 Absence de réaction astrogliale à 4 mois 106
3.9 Désorganisation synaptique dès 4 mois chez les APP/PS1 108
3.10 Schématisation bilan des défauts déjà présents à 4 mois chez les femelles APP/PS1 109
3.11 Pseudo-cinétique d'expression de *Clec7a* et *Cst7* dans le modèle APP/PS1 110
3.12 Cinétique d'expression de *Clec7a* et *Cst7* dans différents modèles murins de la MA 112
3.13 Surexpression de *Cst7* au stade précoce 114
3.14 Surexpression de *Clec7a* au stade précoce 115
3.15 Hétérogénéité microgliale autour des plaques amyloïdes 116
3.16 Corrélation entre concentration d'Aβ_{1-42} et le niveau de surexpression des cibles 117
3.17 Sur-expression microgliale de Dectin-1 à 4 mois 118
3.18 Quantification de l'expression microgliale de Dectin-1 à 4 mois 119
3.19 L'invalidation partielle de *Clec7a* ou de *Cst7* ne modifie pas l'état inflammatoire des BV-2 120
3.20 En conditions basales, *Cst7* et *Clec7a* participent à la sécrétion d'IL-1 . 121
3.21 Effets des cibles sur la réponse transcriptomique induite par une stimulation inflammatoire 122
3.22 Absence d'impact des cibles sur la sécrétion en IL-1 en réponse à une stimulation au LPS 123
3.23 Les cellules *Clec7a*-KD présentent une phagocytose accrue pour l'Aβ_{1-42} 124

3.24 La diminution de l'expression de *Clec7a* induit une acidification des endolysosomes 125
3.25 *CST7* et *CLEC7A* sont sur-exprimés dans les tissus de patients atteints de la MA 127

4.1 Dectin-1 une cible thérapeutique dans la MA ? Protocole d'évaluation . 148

Liste des tableaux

1.1 La réaction microgliale implique de nombreux changements 11
1.2 Principaux essais thérapeutiques dans la MA 26
1.3 Avantages et Inconvénients des approches expérimentales pour étudier la MA 34
1.4 Analyse des différents résultats de l'hétérogénéité microgliale au niveau transcriptomique 48

2.1 Synthèse des données des patients inclus 73
2.2 Liste des primers utilisés pour le génotypage des animaux 76
2.3 Anticorps pour l'immunofluorescence 80
2.4 Concentration et lentivirus utilisés 82
2.5 Anticorps pour Western Blot 86
2.6 Composition des tampons pour la préparation des échantillons pour l'ELISA MSD 86
2.7 Concentrations des fractions solubles dans le triton ou la guanidine utilisées en fonction de l'âge des souris APP/PS1 87
2.8 Liste des séquences des primers utilisés en qPCR. 89

3.1 Faible impact de la pathologie amyloïde sur l'état inflammatoire du tissu cortical chez les femelles APP/PS1 à 4 mois 107

4.1 Différents tests comportementaux pour étudier l'apprentissage et la mémorisation 133
4.2 Synthèse des fonctions mises en évidences pour *Cst7* et *Clec7a* 146

Acronymes

A2AR	Adenosin 2A Receptor
ACh	AcétylCholine
AChE	AcétylCholine Estérase
ADN	Acide Désoxyribo Nucleique
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid Precursor Protein
ARM	Adaptive Reactive Microglia
ARN	Acide Ribo Nucleique
ATP	Adenosine-TriPhosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BACE1	Beta-site APP cleaving enzyme 1
BCA	BiCinchoninic acid Assay
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
CARD9	Caspase-Associated Recruitment Domain 9
CJD	Creutzfeldt–Jakob Disease
CLR	C Leptin Receptor
CMAP	Cystatin-like Metastasis Associated Protein
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPM	Cycling/Proliferating Microglia
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
DAM	Disease Associated Microglia
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNF	Dégénérescence NeuroFibrillaire
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ECL	Enhanced ChemiLuminescent

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay
ELN Endo-Lysosomal Network
EOAD Early Onset of Alzheimer's Disease
ERK Extracellular signal-regulated kinases
ERM Early Response Microglia

FACS Fluorescence Activated Cell Sorting
FIGG Fungal-Induced Glial Granuloma

GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP Green Fluorescent Protein
GLT1 GLutamate Transporter 1
GWAS Genome Wide Association Studies

H1M Homeostatic type 1 Microglia
H2M Homeostatic type 2 Microglia
HEK Human Embryonic Kidney
hiPSC human induced Pluripotent Stem Cell
HSKG House Keeping Gene

I-κB Inhibitor of NF-κB
IDE Insulin Degrading Enzyme
Il-1β Interleukine 1 β
IRF4 Interferon Regulatory Factor 4
IRM Imagerie par Résonnance Magnétique
IRM Interferon Reactive Microglia
ITAM Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

KD Knock-Down
KI Knock-In
KO Knock-Out

LCR Liquide Céphalo-Rachidien
LOAD Late Onset of Alzheimer's Disease
LPS Lipopolysaccharide
LRM Late Response Microglia
LT Lymphocytes T
LTc Lymphocytes T cytotoxiques
LTh Lymphocytes T helper
LTP Long Term Potentiation
LTreg Lymphocytes T régulateurs

MA	Maladie d'Alzheimer
MCI	Mild Cognitive Impairment
MGnD	Microglies de phénotype neurodégénératif
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Class II
MME	Membrane Metallo-Endopeptidase
MMP9	Matrix MetalloProtease 9
MMSE	Mini Mental State Evaluation
MP	Maladie de Parkinson
MT	Microtubules
MTDL	Multi Targeted-Directed Ligand
MWM	Morris Water Maze
NF-κB	Nuclear Factor κB
NfL	Neurofilament light chain
NK	Natural Killer
NLRP3	NOD-Like Receptor Pyrin domain containing 3
NMDA	N-Méthyl D Aspartate receptor
NOS	NO Synthetase
NOX	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate H Oxydase
NSC	Neural Stem Cells
NWD	Non Water Deprived
OIP	Object In Place
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGFB	Platelet Derived Growth Factor subunit B
PFA	Paraformaldhéyde
PIG	Plaque-Induced Genes
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS1	Préséniline-1
PSD95	Post-Synaptic Density protein of 95kDa
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RIN	RNA Integrity Number
RNA-seq	RNA sequencing
ROS	Reactive Oxygen Species
SAG	Syndrome d'Aicardi-Goutières

scRNA-seq	single cell RNA sequencing
SEP	Sclérose en Plaques
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
smFISH	single molecule Fluorescent In Situ Hybridisation
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
snRNA-seq	single nuclei RNA sequencing
SVF	Sérum de Veau Foetal
SVZ	Sub-Ventricular Zone
SYK	Spleen Tyrosin Kinase
TA	Température Ambiante
TEP	Tomographie par Emission de Positon
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2
TRM	Transiting Response Microglia
TSA	Troubles du Spectre Autistique
TTSPAN	Tétraspanines
WD	Water Deprived

1

Introduction

A La microglie

La microglie a été décrite pour la première fois en 1919 par Rio-Hortega (Pour plus d'informations sur l'histoire de la découverte des microglies voir la Revue [Tremblay et al., 2015]) [Rio-Hortega, 1919]. Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC). Elles représentent entre 10 et 15% des cellules cérébrales [Lawson et al., 1990] et y sont les phagocytes mononucléaires les plus abondants [Colonna and Butovsky, 2017]. Chez la souris, elles dérivent majoritairement de monocytes [Chen et al., 2020] et de macrophages primitifs, présents dans le sac vitellin avant le huitième jour de gestation [Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Kierdorf et al., 2013; Cunningham et al., 2013] qui migrent ensuite dans le mésencéphale puis envahissent totalement le cerveau entre E9.5 et E10.5 [Schulz et al., 2012]. Cette colonisation du SNC par les microglies est cruciale pour le bon développement cérébral. À l'âge adulte, les microglies s'auto-renouvellent [Lawson et al., 1992] grâce à la constante stimulation du récepteur CSF1R [Dai et al., 2002]. Cet auto-renouvellement permet de maintenir une quantité stable de microglies, mais c'est un processus lent [Réu et al., 2017; Füger et al., 2017]. Une étude récente utilisant la datation au ^{14}C, démontre un renouvellement d'environ 0.1% des microglies par jour et 28% par an chez l'Homme. Les auteurs de ce travail estiment ainsi que les microglies vivent en moyenne 4.2 ans dans le parenchyme [Réu et al., 2017].

Les microglies sont un sous-type de cellules myéloïdes, elles partagent donc un grand nombre de caractéristiques et marqueurs avec ces dernières. Elles possèdent cependant leur propre signature moléculaire qui permet de les distinguer des autres cellules immunitaires de la même origine [Butovsky et al., 2014].

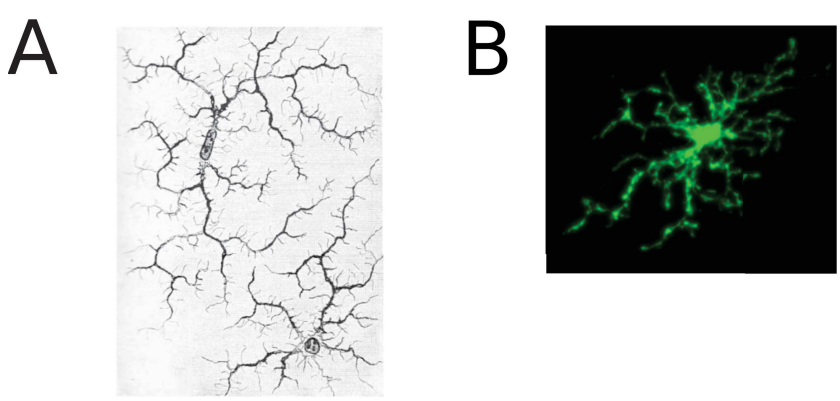


FIGURE 1.1 – **Microglies homéostatiques : un petit corps cellulaire et de longs prolongements** - (A) Représentation originale des microglies par Rio-Hortega [Rio-Hortega, 1919] tirée de [Tremblay et al., 2015]. (B) Immunohistochimie de microglies $CX_3CR_1^{+/eGFP}$.

L'une des caractéristiques cruciales des cellules microgliales est liée à leur morphologie : alors que la position de leur petit corps cellulaire reste stable, leurs longs prolongements sont extrêmement dynamiques [Nimmerjahn et al., 2005]. Ces prolongements permettent à la cellule de scanner son environnement pour détecter toute rupture de l'homéostasie. Ainsi, les microglies sont capables de "percevoir" divers stimuli allant de la fonction neuronale physiologique aux différentes attaques chimiques et microbiennes. Pour intégrer et répondre à ces stimuli, les microglies expriment une grande variété de récepteurs. En effet, outre les récepteurs liés à leur activité immunitaire (PRR, ILR, ChémokineR, etc.), elles expriment aussi un ensemble de récepteurs aux neurotransmetteurs et neuropeptides (AMPAR, NMDAR, mGLUR, P2RY, P2RX, A2Ra, etc.) jouant un rôle crucial dans la communication neuro-gliale [Colonna and Butovsky, 2017].

Les microglies sont donc des cellules pivot dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques qui seront décrits dans cette partie.

A.1 Un couteau Suisse aux nombreux rôles physiologiques

Longtemps ignorées au profit des neurones, les cellules microgliales sont pourtant cruciales pour le bon fonctionnement du SNC. Dès leur invasion de l'encéphale, les microglies contribuent largement au neurodéveloppement. Leurs fonctions évoluent et s'adaptent pour continuer, à l'âge adulte, de protéger et soutenir les fonctions neuronales.

Dans cette partie j'espère vous faire apprécier la diversité et l'importance des fonctions microgliales tout au long de la vie.

A.1.i Un acteur crucial du neurodéveloppement

Au cours du développement cérébral, les microglies régulent le nombre de précurseurs neuronaux jouant ainsi un rôle important dans **la neurogénèse**. En effet, les microglies phagocytent les précurseurs neuronaux et une ablation des microglies par traitement à la minocycline conduit à une augmentation du nombre de progéniteurs [Cunningham et al., 2013]. À l'âge adulte, la microglie conserve ce rôle important de modulateur de la neurogénèse puisque elles phagocytent les précurseurs de la zone sub-ventriculaire (SVZ), l'un des rares sites de neurogénèse adulte [Sierra et al., 2010]. Enfin, au cours du vieillissement, l'activation progressive des microglies dans la SVZ les conduit à secréter plus de cytokines pro-inflammatoires, créant un environnement anti-neurogénique qui diminue la prolifération des cellules souches neurales [Solano Fonseca et al., 2016]. Étant donné que les microglies jouent un rôle anti-neurogénique lors du développement [Cunningham et al., 2013], pro-neurogénique dans la période postnatale [Shigemoto-Mogami et al., 2014], puis de nouveau anti-neurogénique au cours du vieillissement [Solano Fonseca et al., 2016], ces cellules jouent un rôle majeur dans la régulation de la neurogénèse. Leur impact apparaît variable selon (i) le stade développemental, (ii) les stimuli inflammatoires et (iii) leur état d'activation [Solano Fonseca et al., 2016].

Les microglies agissent comme **des guides pour les neurones** durant le dévelop-

pement cérébral. Avant de coloniser tout le cerveau, la population microgliale, attirée par les progéniteurs s'accumule dans des régions cérébrales précises le long de tractus axonaux spécifiques [Arnò et al., 2014]. Du fait de cette localisation, les microglies sont capables d'inhiber la croissance des axones dopaminergiques [Pont-Lezica et al., 2014] et de réguler le positionnement néocortical de certains interneurones [Pont-Lezica et al., 2014; Arnò et al., 2014]. Ces différents effets permettent de comprendre le rôle crucial de la microglie pour orchestrer le développement des réseaux neuronaux.

En modulant la **formation, la maturation ou l'élimination des synapses**, les microglies sont aussi capables de sculpter le réseau neuronal à un niveau encore plus fin. La phagocytose par les microglies, des éléments, à la fois pré- et post-synaptiques, est nécessaire au développement cérébral physiologique [Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014] et passe notamment par la voie du complément [Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012].

A.1.ii Des cellules de soutien pour le maintien de l'homéostasie

La microglie a historiquement été décrite comme faisant partie de la "glue" du SNC, servant uniquement de soutien aux neurones. Ces cellules apportent effectivement, en renfort des astrocytes [Allaman et al., 2011], un soutien crucial pour les neurones. Elles permettent un maintien de l'homéostasie (i) en assurant le nettoyage du parenchyme, (ii) en favorisant la survie neuronale, (iii) en limitant l'excitotoxicité neuronale et (iv) en participant à l'encodage de l'information.

L'une des fonctions principales des cellules microgliales est de permettre le **nettoyage du parenchyme**. L'activité phagocytaire de la microglie est essentielle au maintien de l'homéostasie du parenchyme nerveux. Elles font un travail remarquable d'élimination des débris cellulaires et des neurones dysfonctionnels qui pourraient avoir un impact néfaste sur les fonctions du SNC [Chen et al., 2016].

Les microglies favorisent aussi la **survie neuronale** en libérant de nombreux facteurs neurotrophiques [Glezer et al., 2007] et en modulant la synchronicité corticale. En effet, à l'âge adulte, les microglies peuvent déplacer les synapses inhibitrices pour augmenter la synchronicité corticale. Cette synchronicité résulte en l'activation des voies anti-apoptotiques de BCL-2 et permettent une neuroprotection [Chen et al., 2014] favorisant la survie neuronale.

De plus, les microglies régulent l'**excitotoxicité** neuronale via deux mécanismes. D'une part, elles sont capables de recapter le glutamate ambiant pour limiter son excitotoxicité. La neurotoxicité médiée par le glutamate est, en effet, impliquée dans de nombreux processus neurodégénératifs [Hanisch and Kettenmann, 2007]. En condition physiologique, le glutamate est normalement recapté par les astrocytes avoisinants. En cas d'activation gliale, le TNF-α induit l'expression du transporteur du glutamate GLT1 par la microglie. Cette dernière peut ainsi renforcer l'activité astrocytaire en recaptant le glutamate en excès et contribuer à protéger les neurones [Persson et al., 2005]. D'autre part, les microglies limitent l'hyper-dépolarisation neuronale. En cas d'hyper-excitabilité

neuronale, le neurone en souffrance émet un signal de détresse en relarguant de l'ATP. L'augmentation de la concentration en ATP attire les microglies vers la région "lésée", qu'elles entourent alors avec leurs prolongements, offrant ainsi une protection contre la dépolarisation excitotoxique aux neurones voisins. Les microglies sont donc capables d'induire une neuroprotection hyper-localisée de court terme en cas d'hyper-activité neuronale [Kato et al., 2016].

En continuité de leurs rôles synaptiques lors du neurodéveloppement, les microglies **modulent les connectivités neuronales** à l'âge adulte. Lors de l'apprentissage, la dynamique synaptique est un mécanisme clef pour l'encodage de l'information. Durant cet apprentissage, les microglies induisent la formation de nouvelles synapses via la voie BDNF/TrkB. En parallèle, elles participent à l'élimination de synapses permettant de contrôler le renouvellement synaptique. Enfin, les microglies modifient la composition synaptique en protéines telles que GluN2B, GluNA2 et VGluT1 qui sont cruciales au fonctionnement des synapses excitatrices glutamatergiques [Parkhurst et al., 2013]. En modulant ces protéines synaptiques elles influent sur la maturation synaptique [Zhan et al., 2014], et jouent un rôle crucial dans l'apprentissage, la rétention [Parkhurst et al., 2013] et la mise en place de l'intérêt social [Zhan et al., 2014].

A.2 L'hétérogénéité microgliale

Que ce soit en condition physiologique ou pathologique, les microglies ont souvent été considérées comme une population unique et homogène. Il existe pourtant un grand nombre de sous-populations microgliales [Stratoulias et al., 2019].

A.2.i La localisation microgliale, un facteur souvent oublié

Chez l'adulte, dans le SNC en condition physiologique, l'hétérogénéité des cellules microgliales au sein d'un même individu est majoritairement due à leur localisation (Figure 1.2) [Lawson et al., 1990; Fernández-Arjona et al., 2017; Grabert et al., 2016; Masuda et al., 2019]. Cette hétérogénéité est caractérisée par des variations de leur densité, morphologie, motilité, prolifération, fonction et signature moléculaire (Voir Revue Tan et al. [2020]).

L'une des explications pour cette hétérogénéité repose sur le fait que les microglies sont des macrophages résidents fortement adaptés aux besoins de leur microenvironnement. Les microglies exprimant divers récepteurs aux neurotransmetteurs [Wolf et al., 2017], elles diffèrent donc selon les neurones qu'elles soutiennent. Dans ce sens, la densité microgliale dans les différentes régions semble respecter un certain ratio microglie par neurone. Le nombre de cellules gliales est proportionnel à la masse cérébrale avec un ratio de 3,72 glies par neurone dans le cortex soit 72% de glies [Tan et al., 2020]. Il a aussi été clairement démontré que les microglies de la matière grise sont morphologiquement et fonctionnellement différentes des microglies de la matière blanche [Tan et al., 2020].

Les implications fonctionnelles de cette hétérogénéité régionale physiologique des

microglies est encore mal connue. Néanmoins, leurs mises en évidence pourraient permettre des avancées dans la compréhension de l'implication microgliale dans certaines pathologies.

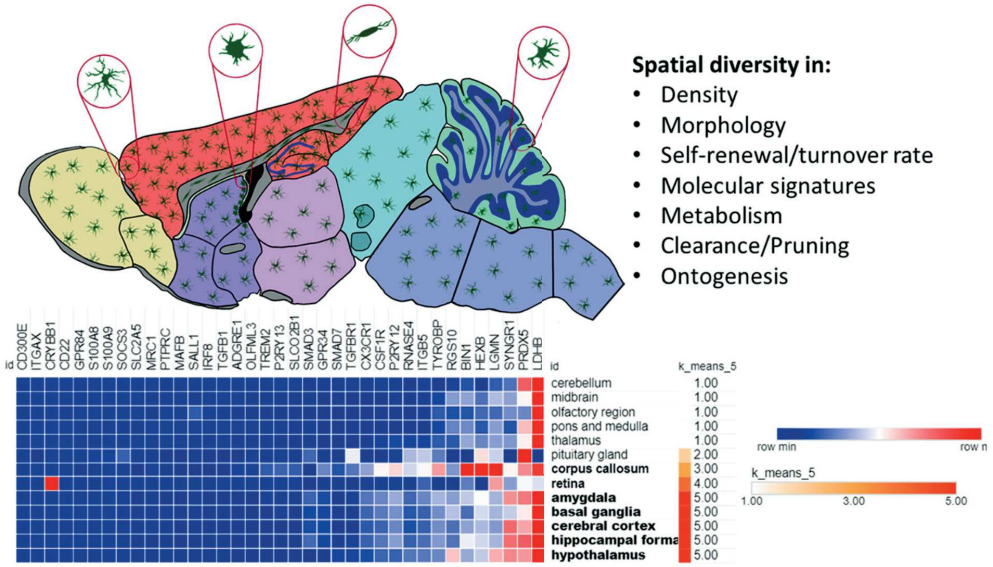


FIGURE 1.2 – **L'hétérogénéité microgliale physiologique est dépendante de la région cérébrale** - Les microglies diffèrent dans leur nombre, forme et signature moléculaire selon la région cérébrale dans un cerveau de souris (Haut). Pour qualifier l'hétérogénéité, les auteurs ont sélectionné, à partir d'études transcriptomiques, un ensemble de gènes microgliaux humains. La Heat-map représente le niveau d'expression de ces gènes par région et montre l'hétérogénéité moléculaire des microglies chez l'Homme. Tiré de Tan et al. [2020]

A.2.ii L'effet du sexe sur les fonctions microgliales n'est pas à négliger

Un nombre croissant d'études mettent en évidence l'impact du sexe sur la morphologie et les fonctions microgliales (Pour plus d'informations voir Publication 1 - Annexes A [Hemonnot et al., 2019] et Publication 2 - B [Hemonnot-Girard et al., 2021]).

La densité microgliale est plus élevée chez les mâles adultes que chez les femelles [Guneykaya et al., 2018; Perkins et al., 2018]. La morphologie cellulaire est aussi affectée par le sexe. En effet, les mâles présentent des cellules avec des corps cellulaires plus gros tandis que chez les femelles les microglies ont des prolongements plus longs [Schwarz et al., 2012; Guneykaya et al., 2018; Weinhard et al., 2018].

Des différences fonctionnelles ont aussi été caractérisées. Chez les mâles, les microglies ont une plus grande capacité de migration alors que les microglies des femelles présentent une augmentation de leur phagocytose [Nelson et al., 2017; Yanguas-Casás et al., 2018]. Par ailleurs, le sexe semble aussi réguler les propriétés électrophysiologiques des cellules microgliales ainsi que leur profil sécrétoire [Guneykaya et al., 2018].

Ces différences laissent penser que chez les femelles adultes les microglies ont un phénotype plus homéostatique, et une analyse transcriptomique a effectivement mis en évidence un profil plus protecteur chez les femelles [Villa et al., 2018].

A.2.iii Impact dans le vieillissement

Contrairement aux autres types de cellules gliales dont la densité reste stable [Colonna and Butovsky, 2017], on observe une augmentation de la densité microgliale au cours du vieillissement [Tremblay et al., 2012; Poliani et al., 2015; Shahidehpour et al., 2021]. Cette hyperplasie [1] microgliale semble déstabiliser la répartition cellulaire au sein du parenchyme cérébral [Hefendehl et al., 2014], et est associée à une dystrophie cellulaire. Parmi les changements morphologiques, on observe une diminution de la taille de leur arborisation [Sierra et al., 2007; Hefendehl et al., 2014] sans modification de leur complexité c'est à dire le nombre de branches par cellule [Hefendehl et al., 2014]. De plus, la taille du soma est augmentée au cours du vieillissement [Sierra et al., 2007; Hefendehl et al., 2014]. De manière intéressante, ces changements morphologiques apparaissent aussi bien dans les modèles murins que chez l'Homme [Streit et al., 2004].

Le transcriptome microglial évolue, lui aussi, avec l'âge. Au cours du vieillissement, l'expression des gènes de l'inflammation et de l'immunité augmente tandis que l'expression de certains gènes homéostatiques diminue [Hickman et al., 2013; Sala Frigerio et al., 2019].

Ces modifications morphologiques et transcriptomiques s'accompagnent de modifications fonctionnelles. D'une part, les microglies couvrent une surface corticale plus faible [Hefendehl et al., 2014; Baron et al., 2014] et leurs prolongements sont moins motiles [Hefendehl et al., 2014]. Leur capacité de surveillance du parenchyme est ainsi diminuée avec l'âge, et les microglies âgées répondent donc plus lentement à un stimulus néfaste [Hefendehl et al., 2014]. D'autre part, la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires est accrue [Sierra et al., 2007; Solano Fonseca et al., 2016]. Cette sur-production inflammatoire crée un environnement anti-neurogénique qui participe à la dégénérescence neuronale [Solano Fonseca et al., 2016].

Au cours du vieillissement physiologique les microglies semblent donc évoluer vers un phénotype réactif. Cette sénescence microgliale est un facteur important à prendre en compte pour les études chez l'Homme. En effet, alors que chez les modèles animaux en laboratoire les conditions de vie sont très normalisées et varient peu, ce n'est pas le cas chez les patients. Ainsi, chaque patient, et donc ses microglies, aura subi différentes infections (du SNC ou non) au cours de sa vie. Ses microglies seront donc dans un état particulier en fonction de leur historique d'activation et les pathogènes rencontrés. Dans ce contexte, des études récentes indiquent que le conditionnement (*priming* [2]) des microglies au cours de la vie serait un facteur de risque de développer la maladie

1. *Augmentation du nombre de cellules.*
2. *Le phénomène de priming est un processus par lequel des microglies préalablement stimulées répondent de manière exacerbée à un nouveau stimulus. Ce processus de mémoire cellulaire implique des modifications épigénétiques.*

d'Alzheimer (MA) [Linard et al., 2020; Ilievski et al., 2018].

A.2.iv Hétérogénéité entre les espèces

L'utilisation de modèles animaux est nécessaire à la compréhension des mécanismes physiopathologiques microgliaux. Les microglies issues de ces différents modèles, bien que comparables avec celles de l'Homme, n'en restent pas moins différentes [Smith and Dragunow, 2014; Hemonnot et al., 2019].

Tout comme chez la souris, les microglies humaines affichent une grande hétérogénéité selon l'âge et la région concernée [Masuda et al., 2019]. Elles présentent des morphologies variées et sont sensiblement différentes des microglies murines [Torres-Platas et al., 2014].

Des études fonctionnelles ont caractérisé la capacité de réponse des microglies humaines à différents stimuli [Melief et al., 2012; Smith et al., 2013]. Pour la plupart, ces études démontrent des résultats similaires avec les réponses de microglies murines. Cependant, certaines de leurs fonctions et caractéristiques sont significativement différentes. En effet, les microglies humaines ont une capacité de prolifération plus faibles que les cellules murines. De plus, en cas d'activation, si elles en produisent, les microglies humaines produisent une quantité bien plus faible de NO que leurs homologues murines. Enfin, les microglies murines et humaines ont des réponses opposées au traitement à l'acide valproique [Smith and Dragunow, 2014].

Les études transcriptomiques concluent aussi que globalement l'expression génique physiologique [Galatro et al., 2017; Gosselin et al., 2017] est très similaire entre les deux espèces. Cependant, bien que ressemblantes par certains aspects, un certain nombre de gènes sont différentiellement exprimés entre les microglies murines et humaines. En particulier, certains gènes de l'immunité ne sont exprimés que dans les microglies humaines [Gosselin et al., 2017] et des différences dans le niveaux d'expression de facteurs de transcription sont observées entres les espèces [Holtman et al., 2017]. Par ailleurs, les différences entre microglies humaines et murines s'accentuent avec l'âge [Galatro et al., 2017].

Pour la majorité des fonctions microgliales, il reste à déterminer si les microglies murines répondent de la même manière que les microglies humaines. Il est donc nécessaire de modérer les résultats obtenus seulement dans les modèles animaux, et à l'avenir il apparaît crucial de développer des approches combinant des échantillons humains en parallèles des modèles animaux classiques.

A.3 La réaction microgliale...

Les microglies surveillent constamment le parenchyme et sont capables, via les récepteurs qu'elles expriment, de détecter des perturbations de l'homéostasie. En réponse à divers stimuli elles peuvent s'adapter en changeant de forme et de fonction afin de rétablir l'ordre. Ainsi, les microglies évoluent d'un phénotype homéostatique, autrefois appelé quiescent, vers un état réactif. Cet équilibre entre les états permet certes de

protéger le SNC mais peut aussi faire défaut et permettre l'apparition ou la progression de pathologies.

A.3.i ... est schématiquement stéréotypée ...

Les microglies sont capables de répondre à une grande variété de stimuli allant de la bactérie aux cytokines, en passant par les ions. La perception de ces signaux est médiée par des récepteurs reconnaissant le danger (DAMPs) ou des protéines associées aux pathogènes (PAMPs) [Heneka et al., 2015]. Deux scénari peuvent engendrer cette réponse : l'apparition de facteurs qui ne sont normalement pas présents dans le SNC (ex. bactérie) ou des composants habituellement présents mais à des concentrations différentes (ex. complément) ou dans des conformations anormales (ex. protéines agrégées) [Hanisch and Kettenmann, 2007].

Lors de cette réaction, les microglies changent de morphologie. Trois sous-types distincts ont d'abord été décrits : homéostatique, compact et améboïde. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, à l'état homéostatique les microglies présentent un petit corps cellulaire et arborent de longs prolongements. Les microglies réactives sont caractérisées par une augmentation du volume de leur corps cellulaire et deviennent plus compactes avec des prolongements longitudinaux ou radiaux courts [Lawson et al., 1990]. Enfin, les microglies peuvent atteindre le stade réactif améboïde où elles deviennent sphériques [Davis et al., 1994; Fernández-Arjona et al., 2017]. Selon leur état, les microglies afficheront donc des morphologies, des fonctions et des marqueurs différents (Table 1.1).

Dans le champ de la réaction microgliale, deux extrêmes ont longtemps été décrits : les microglies pro-inflammatoires (dîtes M1) ou anti-inflammatoires (dîtes M2). Le phénotype M1 est induit par l'activation à la fois des TLRs et de la voie de l'IFNγ. De manière stéréotypée, les microglies M1 produisent diverses cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α, Il-1β, IL-12, CCL2) ainsi que des ROS (espèces réactives de l'Oxygène), des acteurs majeurs de la neurotoxicité. Elles expriment aussi des protéines de l'immunité (MHC-II, Récepteurs Fc). Ces effets ont pour but de neutraliser le pathogène et de polariser les cellules T pour induire une réponse immunitaire adaptative [Orihuela et al., 2016]. Les microglies M1 sont globalement considérées comme délétères. Par contraste, les microglies M2 sont considérées comme protectrices. Ce phénotype anti-inflammatoire peut être induit par l'IL-3, l'IL-4, l'IL-10, ou la détection de corps apoptotiques. Dans ce modèle de réaction, les microglies libèrent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β) et sont associées à la production de facteurs de croissance et de facteurs neurotrophiques [Orihuela et al., 2016; Colonna and Butovsky, 2017].

Les microglies réactives sont capables d'exprimer des récepteurs leur permettant de capturer les antigènes. Elles possèdent aussi la machinerie lysosomale et expriment les récepteurs de MHC-II nécessaires pour la présentation des peptides antigéniques. Elles fonctionnent donc comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) [Colonna and Butovsky, 2017].

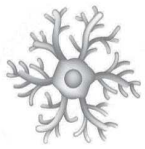
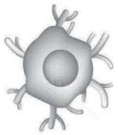
	Homéostatique	**Activée**	**Réactive**
			
Fonctions			
Prolifération	Faible	Moyenne	Élevée
Motilité	Prolongements	++	+++
Présentation d'antigènes	-	++	?
Phagocytose	+	++	+++
Sécrétion de facteurs	+	++	+++
Marqueurs Exprimés			
P2Y12	+++	+	-
Tmem119	+++	+	-
CD45	+	++	+++
TREM2	+	++	+++

TABLE 1.1 – **La réaction microgliale implique de nombreux changements** - Exemples de quelques fonctions et marqueurs altérés dans des états réactifs stéréotypés.

A.3.ii ... mais en réalité polymorphique

Longtemps considérée comme binaire, la réaction microgliale n'est pourtant pas si simple. Ainsi, il est maintenant clairement établi qu'il n'existe pas seulement deux états M1 et M2 [Ransohoff, 2016; Orihuela et al., 2016], mais plutôt une variété d'états réactifs et que ces états ne sont pas aussi stéréotypés que ce qui avait été anticipé [Cherry et al., 2014]. En effet, *in-vivo*, certaines microglies expriment simultanément des marqueurs M1 et M2, invalidant l'hypothèse d'une réaction dichotomique [Chiu et al., 2013; Kim et al., 2016; Sala Frigerio et al., 2019].

La réaction microgliale peut résulter en de nombreux phénotypes morphologiques et fonctionnels (Figure 1.3) [Dubbelaar et al., 2018]. L'orientation de la microglie vers un phénotype plutôt qu'un autre dépend d'un ensemble de facteurs tels que :

- Son état initial : une microglie conditionnée, c'est à dire déjà dans un état réactif, pourra répondre plus rapidement qu'une microglie homéostatique [Ellwanger et al., 2021]. Au contraire une microglie âgée répondra de manière plus lente [Hefendehl et al., 2014].
- Son micro-environnement : que ce soit la région cérébrale, le réseau neuronal qui l'entoure ou l'état d'activation des cellules voisines (ex. astrocytes).
- Le stimulus d'activation : une microglie réagira différemment à une bactérie, de l'amyloïde-β ou un neurone en apoptose [Lively and Schlichter, 2018].
- L'intensité du stimulus : la réponse microgliale sera adaptée à l'intensité du danger pour maintenir l'homéostasie.
- La cinétique de la réaction : En effet, il y aura généralement un pic inflammatoire en réponse au stimulus qui sera suivi d'une phase anti-inflammatoire destinée à

restaurer les tissus.

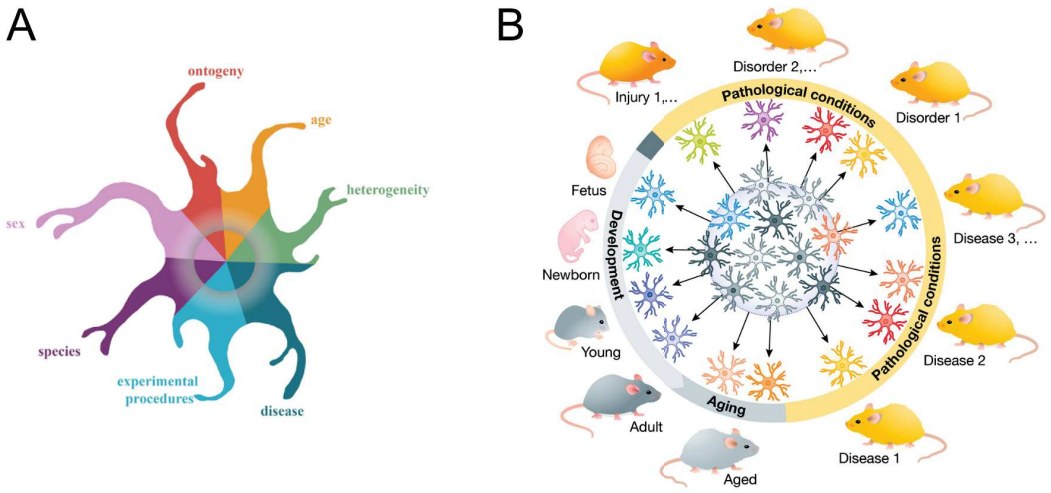


FIGURE 1.3 – **Représentation de la diversité de la réaction microgliale - (A)** Kaléidoscope des phénotypes microgliaux. Ce schéma représente des exemples de facteurs modulant le transcriptome microglial : la région cérébrale, le sexe, l'âge, les pathologies antérieures, les procédures expérimentales et les espèces. L'influence de ces facteurs converge vers le centre représentant l'empreinte épigénétique sur la microglie. D'après [Dubbelaar et al., 2018]. **(B)** La population microgliale est hétérogène (coeur dans le cercle gris) et présente des propriétés et fonctions intrinsèques. Ces différentes microglies réagissent différemment aux variations de l'homéostasie cérébrale qu'elles soient physiologiques (développement) ou pathologiques et conduisent à une multitude d'états réactifs. Tiré de [Stratoulias et al., 2019].

A.4 La neuroinflammation dans les pathologies du SNC

La microglie joue des rôles primordiaux durant le développement et est capable de s'activer de manière à protéger le parenchyme. Parfois, les microglies font défaut ou le mécanisme d'inflammation s'emballe, participant à l'établissement de diverses pathologies du SNC [Wolf et al., 2017].

Les cellules microgliales peuvent être sollicitées dans des cas très différents. Dans la plupart des pathologies du SNC, une neuroinflammation, caractérisée notamment par une réaction microgliale, se met en place. Cette réaction joue un rôle important lors d'évènements brefs tels que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les lésions de la moelle épinière, mais aussi dans des pathologies neurodéveloppementales ou chroniques. Dans l'ensemble de ces pathologies, l'implication microgliale dans cette neuroinflammation est difficile à caractériser. S'il s'agit d'un processus clef qui précède l'atteinte neuronale ou s'il ne s'agit que d'une réponse à cette dernière est toujours intensément débattue.

Dans le cas de **pathologies aiguës** tels que les AVC ou les traumatismes médullaires, les microglies semblent jouer un rôle majoritairement bénéfique. En effet, lors d'AVC, les microglies sont les premières cellules activées sur le site de la lésion où elles éliminent les débris cellulaires et contribuent à la résolution de la neuroinflammation [Benakis et al., 2015]. Dans les lésions de la moelle épinière, les microglies sont importantes pour l'élimination des neurones lésés et la cicatrisation [Kroner and Rosas Almanza, 2019]. Néanmoins, leurs effets sur la cicatrisation ne sont cependant pas toujours bénéfiques, puisqu'une diminution de la prolifération microgliale peut améliorer la récupération fonctionnelle [Gerber et al., 2018]. Ainsi, les rôles bénéfiques/délétères des microglies dépendent probablement de la fenêtre temporelle suivant la lésion.

Il est maintenant admis que les facteurs pro-inflammatoires jouent un rôle central dans l'étiologie de nombreuses **maladies neurodéveloppementales et psychiatriques** comme les troubles du spectre autistique (TSA) [Petrelli et al., 2016], la dépression [Brites and Fernandes, 2015] ou la schizophrénie [Leza et al., 2015]. Ainsi, dans ces contextes, on observe très souvent une altération des fonctions microgliales. Par exemple, les études transcriptomiques ont permis de révéler une association forte entre la survenue des TSA et des altérations des gènes inflammatoires et immunitaires. Dans des échantillons post-mortem de patients TSA, une augmentation de la prolifération et une réaction microgliale sont aussi observées [Petrelli et al., 2016]. Par ailleurs, l'injection de poly I :C, un agent simulant une infection virale, pendant la gestation induit le développement d'un phénotype schizophrénique chez les souriceaux et est utilisé comme modèle expérimental de schizophrénie. Chez ces souris, on note une réaction microgliale associée à une production de ROS menant à une neuroinflammation [Leza et al., 2015]. De manière générale, l'hypothèse actuelle est que la gliose réactive induirait un défaut de maturation ou d'élimination des synapses au cours du développement, perturbant la mise en place des réseaux neuronaux. Les réseaux neuronaux dysfonctionnels seraient ensuite responsables de l'apparition des troubles psychiatriques. Ainsi, durant le neurodéveloppement, la réaction microgliale apparaît majoritairement délétère. De manière intéressante, les médicaments utilisés dans le cadre des maladies psychiatriques sont souvent des molécules à visée anti-inflammatoire [Berthold-Losleben et al., 2009; Miller and Raison, 2015].

Contrairement aux évènement brefs où la réaction microgliale est globalement bénéfique et aux troubles psychiatriques où elle est plutôt néfaste, dans les **maladies neurodégénératives** les microglies réactives ont des fonctions complexes et à double tranchant. Dans ces pathologies, sclérose en plaque (SEP) [Bogie et al., 2014], sclérose latérale amyotrophique (SLA) [Brites and Vaz, 2014], maladie de Parkinson (MP) [Surendranathan et al., 2015] ou la maladie d'Alzheimer (MA, Voir parties C.2 et C), la réaction microgliale est importante et a d'abord été décrite comme une conséquence néfaste de l'atteinte neuronale. Des résultats récents ont néanmoins remis en cause ce concept. Le rôle bénéfique ou délétère de la réaction microgliale, que cette dernière soit précoce ou tardive, est le sujet d'intenses débats et de nombreuses études. D'une part, les microglies peuvent jouer des rôles bénéfiques en phagocytant des éléments patho-

géniques tels que les agrégats d'α-synucléine dans la MP ou d'Aβ dans la MA. Elles interviennent aussi dans la gestion des défauts de la myéline dans la SEP. D'autre part, les microglies sont aussi associées à une neuroinflammation toxique [3] responsable de la neurodégénérescence pour la MA, MP et SLA ou de la démyélinisation dans le cas de la SEP [Bogie et al., 2014]. Les microglies sont alors présumées responsables de la progression de la maladie. Par ailleurs, on les soupçonne de jouer un rôle dans l'initiation de la SLA [Brites and Vaz, 2014] ou de la MA (Voir partie C.2). Ainsi, la réaction microgliale joue des rôles ambivalents dans nombreuses pathologies neurodégénératives. L'une des explications pour cette ambivalence étant que les effets microgliaux seraient variables au cours du temps.

En définitive, l'implication pathologique des microglies dépend certainement du contexte et de la fenêtre temporelle étudiée. Ce constat impose de comparer les différents stades de développement de la pathologie, en particulier de distinguer les stades précoces et tardifs, pour mieux décortiquer les rôles des cellules microgliales. Ces derniers peuvent, en effet, être drastiquement différents dans (i) la mise en place, (ii) la progression ou (iii) l'éventuelle résolution de la pathologie.

3. *La neuroinflammation peut devenir toxique et induire la mort cellulaire en activant les voies du complément, des ROS ou encore par défaut des fonctions support.*

B La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus commune et irréversible de démence chez les personnes âgées. Elle a été initialement décrite par le Dr Aloïs Alzheimer en 1907 [Alzheimer, 1907]. À cette époque déjà, la pathologie est décrite comme induisant divers troubles cognitifs associés à de multiples lésions cérébrales [Stelzmann et al., 1995].

B.1 Prévalence et incidence

Depuis sa première caractérisation en 1907, le nombre de cas de maladie d'Alzheimer n'a fait qu'augmenter. On estime qu'en 2050, elle touchera plus de 106 millions de personnes de par le monde [Brookmeyer et al., 2007]. La prévalence de la MA varie selon la forme qui est considérée. Les formes familiales sont caractérisées par des mutations sur les gènes de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) ou les présénilines (PS1, PS2). Ces formes génétiques, héréditaires, se développent entre 30 et 60 ans et représentent entre 1 et 5% des patients [Bekris et al., 2010]. Les formes les plus communes sont appelées sporadiques et surviennent le plus souvent chez des personnes de plus de 65 ans. Ces formes sporadiques se développent selon un ensemble complexe de facteurs de risques touchant à la génétique, l'environnement et le style de vie. De plus, l'âge d'apparition de la pathologie permet de classer les patients selon deux catégories : les EOADs (Early Onset of Alzheimer's Disease) développant la MA avant 65 ans ou les LOADs (Late Onset of Alzheimer's Disease) développant la maladie après 65 ans.

L'un des principaux facteurs de risque de développer la MA est l'âge. La prévalence de la pathologie passe ainsi de 1% chez les personnes âgées de 60 à 70 ans, à 6-8% chez ceux de 85 ans et plus [Bekris et al., 2010].

Un autre facteur influençant la survenue de la MA est le sexe. En effet, la prévalence de la MA est deux fois supérieure chez les femmes [Hebert et al., 2013]. Une partie de l'explication repose sur la longévité plus accrue des femmes mais des études récentes laissent à penser que ce n'est pas la seule explication [Viña and Lloret, 2010]. Les caractéristiques de la pathologie en elles mêmes sont aussi impactées par le sexe. Les femmes présentent une détérioration cognitive plus rapide que les hommes avec notamment des altérations plus fortes dans la mémoire verbale. Les comorbidités associées à la MA chez les patients sont aussi différentes selon le sexe. Alors que les hommes développeront de l'apathie ou de l'agitation, les femmes présenteront plutôt des syndromes dépressifs et un retrait social. De plus, l'évolution des biomarqueurs ainsi que les facteurs de risques de la MA sont différents entre les hommes et les femmes. En effet, les femmes semblent plus sensibles aux effets d'ApoEε4 pour la survenue de la MA [Ferretti et al., 2018].

Dans l'ensemble, l'étiologie précise des formes sporadiques de la MA est toujours très mal connue.

B.2 Caractéristiques pathologiques

Depuis sa première caractérisation histopathologique par le Dr Alzheimer, la pathologie éponyme a fasciné le monde de la science. En effet, le nombre de recherche sur la MA augmente de manière exponentielle pour atteindre, à l'heure actuelle, plus de 165 000 publications. D'abord décrite comme une démence sénile, une maladie du vieillissement, elle a ensuite été reconnue comme une pathologie à part entière.

Déjà décrits à l'origine, les **troubles cognitifs** associés aux altérations cérébrales sont nombreux. Les patients souffrent notamment de désorientation spatio-temporelle, de pertes de la mémoire et enfin de troubles du langage. Il existe aussi une forte association entre la MA et certains troubles psychiatriques tels que l'apathie, la dépression ou encore l'agressivité [Deardorff and Grossberg, 2019]. L'ensemble de ces symptômes mènent à une perte d'autonomie des patients.

Du point de vue histologique, la MA est une **protéinopathie** complexe qui se caractérise par une agrégation de la protéine Tau associée aux microtubules et du peptide amyloïde β (Aβ). La pathologie amyloïde est associée au peptide Aβ présent en trop grande concentration qui s'agrège sous forme de plaques amyloïdes extracellulaires (Figure 1.4 A). Les plaques amyloïdes apparaissent d'abord au niveau cortical puis progressent vers l'intérieur de l'encéphale selon les stades de Thal (Figure 1.4 Haut). Cette propagation au sein de l'encéphale pourrait être due à des propriétés de l'Aβ de type prion [Walker et al., 2002; Meyer-Luehmann et al., 2006]. En parallèle, la tauopathie est associée à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (P-Tau) qui s'agrège dans les neurones formant les dégénérescences neurofibrilaires (DNF) intracellulaires (Figure 1.4 B). Les DNFs apparaissent d'abord au niveau central puis progressent vers l'extérieur de l'encéphale selon les stades de Braak (Figure 1.4 Bas). Tout comme l'amyloïde, la protéine Tau pourrait présenter des propriétés de type prion permettant sa dissemination dans l'encéphale [De Calignon et al., 2012]. De manière intéressante, contrairement aux stades de Thal [Serrano-Pozo et al., 2016], les stades de Braak corrèlent avec la progression des déficits cognitifs chez les patients [Nelson et al., 2007].

Bien qu'observée dès 1907, le rôle de la **neuroinflammation** dans la pathologie fut négligée durant des décennies. Elle se caractérise par une réaction microgliale (Figure 1.4 C-D) et astrocytaire, présente à la fois dans les cellules associées aux plaques amyloïdes mais aussi au niveau de celles associées au neurones porteurs de DNFs.

L'ensemble des défauts protéiques, et de la neuroinflammation mènent à une **déstabilisation des réseaux neuronaux**. D'une part, les neurones présentent un nombre d'épines dendritiques qui diminue avec la progression de la MA ce qui est associé à une hyperexcitabilité des réseaux [Brown et al., 2018]. D'autre part, les modifications de la morphologie neuronale sont accompagnées de **Neurodégénérescence** (Figure 1.4 E). Les neurones cholinergiques sont particulièrement touchés par cette mort cellulaire [Craig et al., 2011].

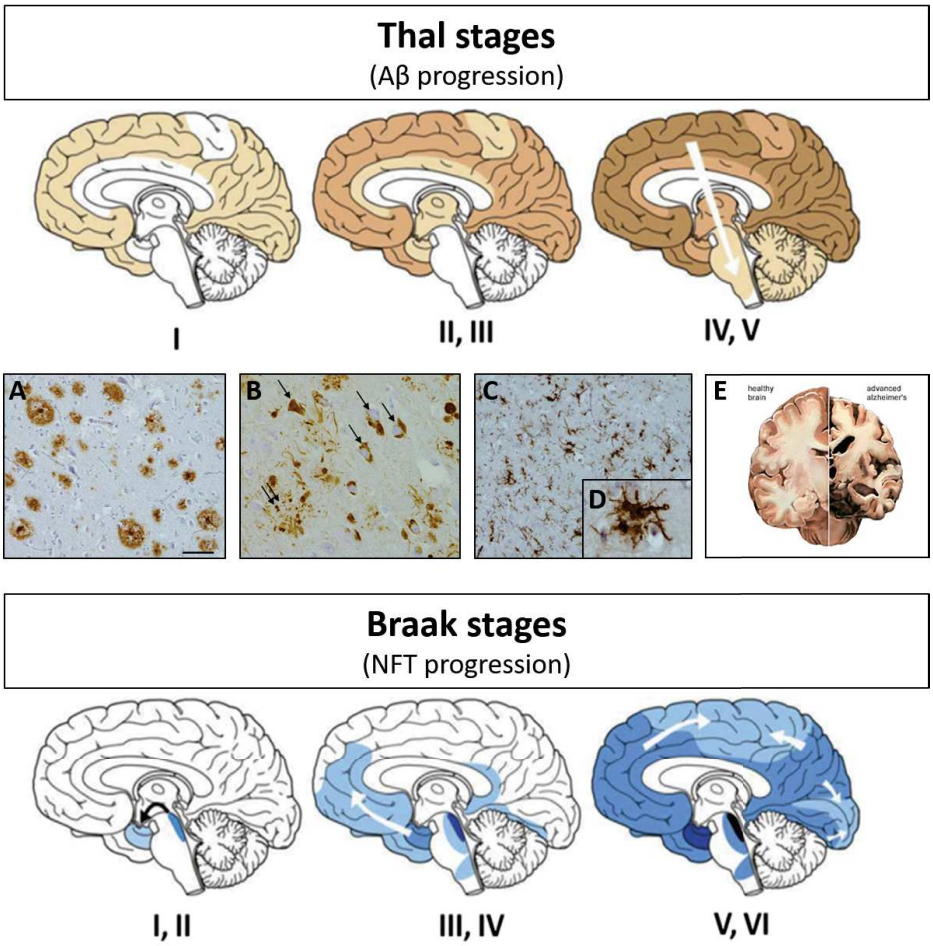


FIGURE 1.4 – **Caractéristiques histopathologiques de la MA chez l'Homme** - Dans le cortex des patients atteints de la MA on observe différentes lésions : **(A)** des plaques amyloïdes qui se propagent au sein du SNC selon les stades de Thal. **(B)** des DNFs dans les neurones indiqués par les flèches, qui se propagent au sein du SNC selon les stades de Braak. **(C-D)** Une microgliose. Ces altérations mènent à une neurodégénérescence qui conduit *in fine* à une atrophie corticale **(E)**. NFT, Neuro Fibrillary Tangles. Barre d'échelle : 50 μm. Adapté de [Lane et al., 2017; Jouanne et al., 2017].

B.3 Pourquoi la MA se développe t-elle ?

Chacune des caractéristiques de la MA décrites ci-dessus a donné naissance à une théorie sur l'étiologie de la pathologie. Alors que les écoles anciennes impliquent l'amyloïde-β ou Tau, plus récemment, de nouvelles théories émergent.

B.3.i L'amyloïde-β au coeur de la pathologie

L'APP est une protéine membranaire dont les rôles physiologiques sont peu connus à ce jour. Elle pourrait cependant être impliquée dans la pousse neuritique [Hoe et al., 2009], la formation de synapses [Priller et al., 2006] ou la plasticité cérébrale [Turner et al., 2003]. Le clivage de l'APP a quant à lui été très étudié : dans les organelles, l'APP peut être clivé par 3 familles d'enzymes, les α-, β- ou γ-sécrétases. Selon les enzymes im-

pliquées, le clivage de l'APP peut emprunter deux voies : l'une dite non-amyloidogénique et l'autre, dite amyloidogénique, conduisant à la production de l'amyloïde-β (Figure 1.5).

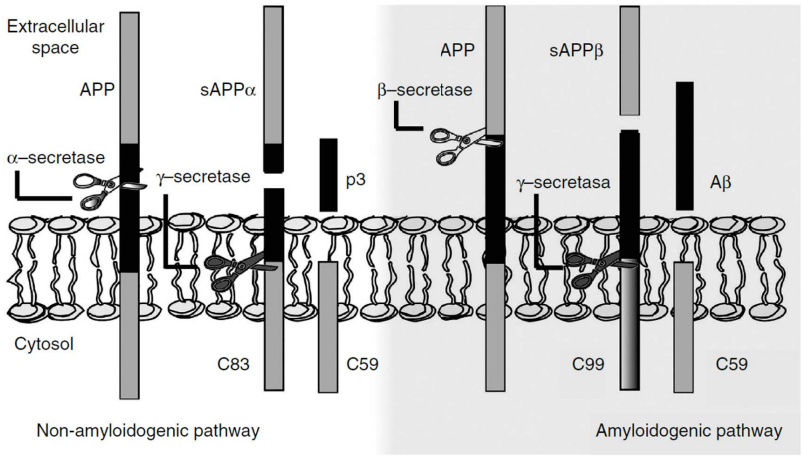


FIGURE 1.5 – **Voies de dégradation de l'APP** - La dégradation de l'APP peut emprunter deux voies selon les sécrétases impliquées : la voie non-amyloidogénique (Gauche) ou la voie amyloidogénique (Droite). Issus de [Rius-Pérez et al., 2018]

L'Aβ est un peptide de 37 à 49 acides aminés dont les rôles physiologiques sont peu étudiés [Turner et al., 2003; Mullane and Williams, 2020]. Il semble jouer un rôle dans la prolifération des cellules souches neurales [Bernabeu-Zornoza et al., 2019] ou encore dans la défense contre le stress oxydant [Castellani et al., 2006].

Ce peptide peut être dégradé par différentes protéases telles que l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE), la métalloprotéase 9 (MMP9) ou la neprilysin (MME). Cette dégradation peut se faire de manière extracellulaire lorsque les enzymes sont sécrétées comme IDE ou de manière intracellulaire par MME dans la microglie. Le peptide Aβ peut aussi être dégradé par des mécanismes de clairance non spécifiques. L'efflux du peptide soluble peut se faire par différentes voies : par la barrière hématoencéphalique (BHE) dans la circulation ou le liquide céphalo rachidien (LCR). Cet efflux peut-être facilité ou inhibé par des protéines chaperonnes comme l'apolipoprotéine E (ApoE) [Lee and Landreth, 2010]. De manière intéressante, dans des cas sporadiques de la MA, une clairance insuffisante de l'Aβ a été identifiée comme une voie pathogénique majeure [Heneka et al., 2015].

Dans le contexte de la MA, le peptide Aβ est anormalement abondant. L'augmentation de sa concentration peut être attribuée soit à une sur-production, due à une hyperactivité des β-sécrétases, soit à une diminution de sa clairance. Cette concentration sur-élevée favorise son agrégation sous forme d'oligomères puis de fibriles formant ensuite les plaques denses caractéristiques de la MA (Figure 1.6).

Pendant longtemps, le mécanisme physopathologique prépondérant reposait sur la toxicité de ces plaques denses, les croyant responsables des dommages cellulaires. De

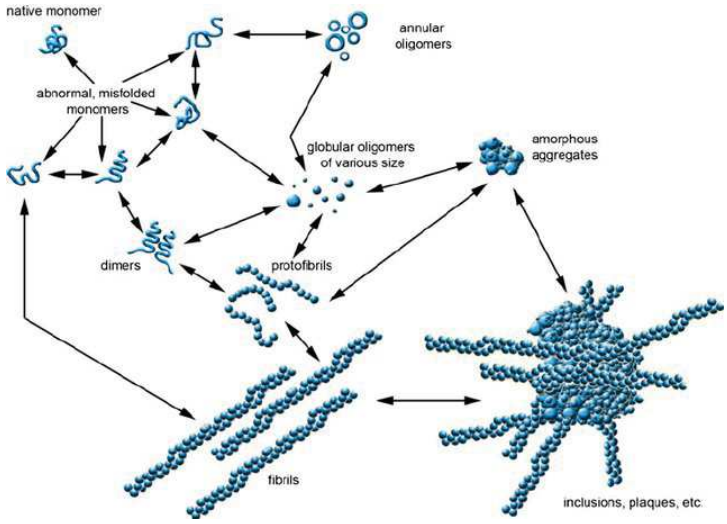


FIGURE 1.6 – **Schématisation des voies d'agrégation amyloïde** - La formation de fibriles peut se faire selon différentes voies et intègre divers intermédiaires dont les oligomères et protofibriles. Ces voies ne sont pas nécessairement exclusives. Les fibriles s'agrègent ensuite pour former les plaques caractéristiques de la MA. Pour chaque protéine amyloïdogénique le processus d'agrégation varie considérablement selon : ses propriétés, ses modifications post-traductionelles et son micro-environnement. Tiré de [Lotz and Legleiter, 2013]

plus en plus de preuves démontrent cependant que ce sont les oligomères qui sont les plus toxiques [He et al., 2012; Cline et al., 2018]. Les oligomères ont un effet dramatique sur l'intégrité de la membrane plasmique : ils y forment des pores et réduisent sa fluidité, pouvant ainsi mener à la mort cellulaire. Ces effets membranaires altèrent aussi les fonctions physiologiques neuronales, entraînant notamment une diminution de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe [Yasumoto et al., 2019]. Les oligomères sont aussi capables d'activer les microglies et les astrocytes induisant un terrain neuroinflammatoire toxique pour les neurones.

Cette hypothèse amyloïde est intéressante et a prévalu pendant longtemps, elle néglige cependant certaines données cliniques importantes. Par exemple, des sujets âgés peuvent présenter une sur-production et une agrégation d'Aβ sans pour autant présenter de signes de démence [Katzman et al., 1988; Davis et al., 1999; Wegiel et al., 2001; Mullane and Williams, 2020]. Ces données suggèrent que la cascade amyloïde fait partie intégrante du vieillissement physiologique. Ces contradictions remettent ainsi en cause une implication unique de la cascade amyloïde dans la MA.

B.3.ii La protéine Tau responsable de la neurodégénérescence

La protéine Tau est une protéine du cytosquelette associée aux microtubules (MT). Elle est responsable de leur stabilité et de leur intégrité. En réponse à l'activité synaptique, la protéine Tau est dirigée vers la post-synapse pour participer à la régulation de l'activité synaptique [Frandemiche et al., 2014]. Tau peut subir différentes modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations ou glycosylations. Notamment, elle

peut être phosphorylée sur 80 sites différents, majoritairement des sérines et thréonines [Sergeant et al., 2005]. La phosphorylation physiologique de la protéine Tau induit son détachement des MT permettant le transport intracellulaire des organelles et vésicules sécrétoires [Pradeepkiran et al., 2019].

Dans la MA, les DNFs sont localisées dans les corps cellulaires des neurones et sont composées de Tau hyperphosphorylée insoluble. La toxicité de ces éléments dépend des sites de phosphorylation. Les phosphorylations les plus délétères sont celles sur les résidus T231, S235, et S262 car elles induisent la perte totale de la liaison entre Tau et les MT [Bramblett et al., 1993; Lindwall and David Cole, 1984] favorisant son agrégation et donc la formation de DNF [Alonso et al., 2001]. Cette hyperphosphorylation conduit à un défaut de transport axonal [Pradeepkiran et al., 2019] ainsi que des défauts synaptiques [Hoover et al., 2010] causant la neurodégénérescence [Husna Ibrahim et al., 2020]. Enfin, on observe une réaction gliale autour des neurones contenant des DNFs à la fois chez l'Homme [Bellucci et al., 2011; Nilson et al., 2017] et dans les modèles animaux de la MA [Nilson et al., 2017]. L'ensemble de ces observations suggère que la pathologie Tau contribue non seulement à la mort neuronale, mais aussi au développement de la neuroinflammation dans la MA [Naseri et al., 2019].

Les DNFs apparaissant après les agrégats amyloïdes, le rôle de Tau (ou les DNFs) dans la mise en place de la MA est donc assez peu étudié (voir Figure 1.12). Par ailleurs, il existe plus d'une vingtaine de pathologies présentant des DNFs qui sont regroupées sous le terme de tauopathies. Dans l'ensemble, ces données indiquent que les défauts de Tau ne peuvent être, à eux seuls, à l'origine de la MA. Cependant, ils en représentent certainement un point clé.

B.3.iii Aβ et Tau agissent ensemble

L'implication de l'Aβ et de P-Tau dans la MA ne sont plus à démontrer. Alors que la plupart des études se focalisent sur l'une ou l'autre des protéines, il parait impossible de réduire la MA à seulement l'une de ces protéines, et ces deux acteurs semblent agir ensemble pour induire la pathologie. Ainsi, des études *in-vivo* démontrent que la toxicité de l'Aβ peut-être modulée par Tau et qu'à l'inverse une pathologie Tau peut être augmentée par l'Aβ [Bloom, 2014]. De manière schématique, il semble que l'Aβ agisse avant Tau en créant une boucle pathogénique impliquant Tau. L'Aβ initierait des voies moléculaires causant les dysfonctions synaptiques liées à Tau.

En conclusion, Aβ et P-Tau sont toutes les deux nécessaires mais non-suffisantes à la mise en place et au développement de la MA en tant que telle. Ce constat met en lumière, qu'il est donc crucial de s'intéresser à un ensemble de facteurs, plutôt qu'à une seule protéine en particulier pour comprendre la MA.

B.3.iv La Neuroinflammation, une autre caractéristique clef de la MA

La neuroinflammation dans la MA a longtemps été considérée comme un facteur secondaire intervenant en réponse à l'agrégation de l'amyloïde et de Tau, et à la neuro-

dégénérescence.

Des analyses post-mortem des patients atteints de la MA démontrent que ces cerveaux présentent une forte réponse inflammatoire [Sudduth et al., 2013; Gomez-Nicola and Boche, 2015], et notamment une augmentation des niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires [Dickson et al., 1993; Griffin et al., 1989]. De nos jours, il existe des outils non-invasifs pour suivre la neuroinflammation (PET, dosage sanguins, etc.). De manière surprenante, cette neuroinflammation progresse avec le décours de la pathologie [Hamelin et al., 2018] de manière non linéaire [Fan et al., 2017]. Différents acteurs du parenchyme nerveux sont responsables de cette inflammation, nous présentons ci-dessous un résumé de leurs implications respectives.

Les microglies

En tant que cellules immunitaires du SNC, les microglies sont sous les feux des projecteurs. Dans le cadre de la MA, elles sont capables de jouer une grande variété de rôles (phagocytose, sécrétion de cytokines...) qui seront détaillés ultérieurement dans la Section C.

Les astrocytes

Les astrocytes sont eux aussi des acteurs cruciaux de la neuroinflammation. Dans la MA, une réaction astrocytaire caractérisée par une augmentation de l'expression de GFAP ainsi que des changements morphologiques est observée [Ben Haim et al., 2015]. À ce jour, l'impact fonctionnel précis de cette réaction est encore débattu.

Dans le cadre de la MA, un grand nombre des fonctions "support" qu'ils apportent aux neurones et au tissu nerveux, telles que la recapture du glutamate, le support métabolique, la production de molécules antioxydantes ou encore la régulation de la transmission synaptique sont altérées [Ben Haim et al., 2015]. Les astrocytes réactifs pourraient aussi être des acteurs du développement de la MA. Par exemple, dans le modèle APP/PS1, les astrocytes réactifs semblent favoriser l'agrégation amyloïde et l'apparition des défauts cognitifs [Ceyzériat et al., 2018].

Bien que l'activation astrocytaire semble majoritairement délétère, il est crucial de prendre en compte le stade de la MA pour remettre en perspective ces fonctions astrocytaires.

Les cellules immunitaires périphériques

Dans le cas de la MA, les cellules immunitaires périphériques peuvent infiltrer le parenchyme cérébral et s'accumuler au niveau des zones lésées [Dionisio-Santos et al., 2019; Lindestam Arlehamn et al., 2019]. Parmi ces cellules infiltrantes, différentes populations cellulaires sont retrouvées telles que les monocytes et lymphocytes T (LT). Il existe de nombreux sous-types de LT, comprenant les LT cytotoxiques (LTc, CD8+), les

LT helper (LTh, CD4+) et les LT régulateurs (LTreg). Alors que l'effet des monocytes infiltrants semble plutôt positif car ils participent à la clairance des dépôts amyloïdes [Dionisio-Santos et al., 2019], le rôle des LTs est encore débattu.

Dans un modèle murin de tauopathie, une étude récente démontre l'implication délétaire des LTc dans le développement de la pathologie. En effet, leur ablation permet chez ces souris de restaurer d'une part la mémoire spatiale et d'autre part l'état inflammatoire du parenchyme nerveux [Laurent et al., 2017].

Par ailleurs, les fonctions des LTh et LTreg dans la MA sont controversées. Alors que des études démontrent que les LTh permettent la clairance de l'Aβ en activant la microglie, d'autres affirment que ces cellules aggravent la pathologie par la sécrétion d'IFNγ [Dionisio-Santos et al., 2019]. Par ailleurs, dans les modèles APP/PS1 [Dansokho et al., 2016] et 3xTg [Baek et al., 2016], la déplétion des LTreg participe à l'accélération de la MA et leur stimulation semble protectrice contre cette dernière. Au contraire, chez les 5xFAD, Baruch et al. démontrent une diminution de la pathologie amyloïde ainsi que de meilleures performances cognitives chez des animaux déplétés en LTreg. Ces résultats contradictoires peuvent certainement s'expliquer en partie par des différences entre les modèles et le stade d'étude de la pathologie. Le rôle des LT dans la progression de la MA reste donc encore à élucider.

À l'heure actuelle, les mécanismes responsables du développement de la MA sont encore mal connus. Il parait évident qu'il s'agit d'une pathologie multi-factorielle dans laquelle, l'Aβ, P-Tau et la neuroinflammation s'entremêlent et conduisent à terme à la mort neuronale responsable des perturbations cognitives observées chez les patients. Comprendre son initiation est un point crucial pour le développement de thérapies susceptibles de ralentir la progression de la pathologie.

B.4 Diagnostic et Traitements

L'impact sanitaire, social et économique de la MA place la recherche de biomarqueurs et de thérapies comme l'un des "challenge du siècle".

Lorsqu'un patient présente des troubles cognitifs, sa famille le pousse généralement à consulter un neurologue. Ce spécialiste réalise alors un ensemble de tests cognitifs (Mini Mental State Evaluation, Free and Cued Selective Reminding Test, etc.) pour caractériser ces défauts et tenter de diagnostiquer une MA ou une pathologie associée. Les troubles cognitifs pouvant être communs à plusieurs pathologies, les médecins ont alors besoin de combiner ces tests à la détection de biomarqueurs afin de préciser le diagnostic.

De nombreux biomarqueurs sont utilisés ou en cours de développement, mais ceux-ci sont encore trop peu efficaces. Il existe aussi plusieurs médicaments disponibles sur le marché mais leur efficacité est faible voire controversée. La nécessité de développer des biomarqueurs et des médicaments fiables et efficaces se fait d'autant plus pressante que le nombre de patients ne cesse d'augmenter.

B.4.i Les biomarqueurs actuellement utilisés

Le développement de biomarqueurs pour la MA est le sujet d'un effort considérable depuis ces 30 dernières années. La combinaison entre biomarqueurs d'imagerie cérébrale et biomarqueurs circulants (détectés dans le sang ou le LCR) permet de clarifier le diagnostic entre différentes pathologies du SNC.

L'imagerie par résonance magnétique (**IRM**) est un examen pouvant être prescrit en cas de suspicion de MA [Frisoni et al., 2010; Ledig et al., 2018]. Elle permet de visualiser et mesurer les changements morphologiques cérébraux. Les patients atteints de la MA présentent différentes altérations qui apparaissent de manière séquentielle [Frisoni et al., 2010] (Figure 1.7) :

1. une augmentation de la taille des ventricules ;
2. une atrophie du cortex enthorinal ;
3. puis une atrophie hippocampique ;
4. enfin l'atrophie du néocortex temporal.

Une seconde technique d'imagerie peut être utilisée : la tomographie par émission de positons (**TEP**). Cette technique basée sur des composés radioactifs marqués au ^{11}C ou au ^{18}F permet de visualiser l'amyloïde [Mullane and Williams, 2020; Hampel et al., 2020; Kim and Lingler, 2019], P-Tau [Schöll et al., 2017; Hampel et al., 2020] ou encore la neuroinflammation [Janssen and Mach, 2019]. Par rapport aux sujets contrôles, les patients atteints de la MA présentent des signaux plus élevés pour le Composé B de Pittsburgh (C^{11}-PIB), un marqueur de l'Aβ fibrilaire [Ikonomovic et al., 2012], pour le Flortaucipir, un marqueur de P-Tau [Schöll et al., 2017] et pour le ^{11}C-PK1119, un marqueur de la neuroinflammation (Figure 1.7). Bien qu'ils soient utiles, ces outils diagnostiques doivent être utilisés avec précaution et ne constituent pas des outils absolus. En effet, il a été montré que des sujets âgés non-déments pouvaient aussi présenter des signaux amyloïdes positifs [Mullane and Williams, 2020]. De même, l'augmentation en P-Tau n'est pas spécifique de la MA mais est commune à toutes les tauopathies. Enfin, les marqueurs de neuroinflammation ne sont pas spécifiques d'un type cellulaire particulier [Lavisse et al., 2012]. La complexité de la neuroinflammation nécessite le développement de biomarqueurs plus spécifiques. Plusieurs autres traceurs radioactifs spécifiques de la microglie ou des astrocytes sont ainsi en cours de développement [Cavaliere et al., 2020].

L'utilisation de ces techniques d'imagerie étant très coûteuse, de nombreux efforts ont été mis en oeuvre pour développer des **biomarqueurs périphériques** (pour plus de détail voir Revue Simrén et al. [2020]). Dans le LCR, les études réalisées ont permis de montrer que les patients atteints de la MA présentent une diminution de la concentration en Aβ_{1-40} et Aβ_{1-42}, reflet de l'agrégation cérébrale de ces peptides [Lehmann et al., 2013; Mullane and Williams, 2020]. À l'opposé, les concentrations en Tau et P-Tau sont augmentées chez les patients MA reflétant la mort neuronale, la déstabilisation synaptique ainsi que la formation des DNFs [Mullane and Williams, 2020]. De manière intéressante, la mesure de P-Tau circulant constituerait l'un des meilleurs biomarqueurs du développement de la MA, et permettrait de distinguer les patients atteints de la

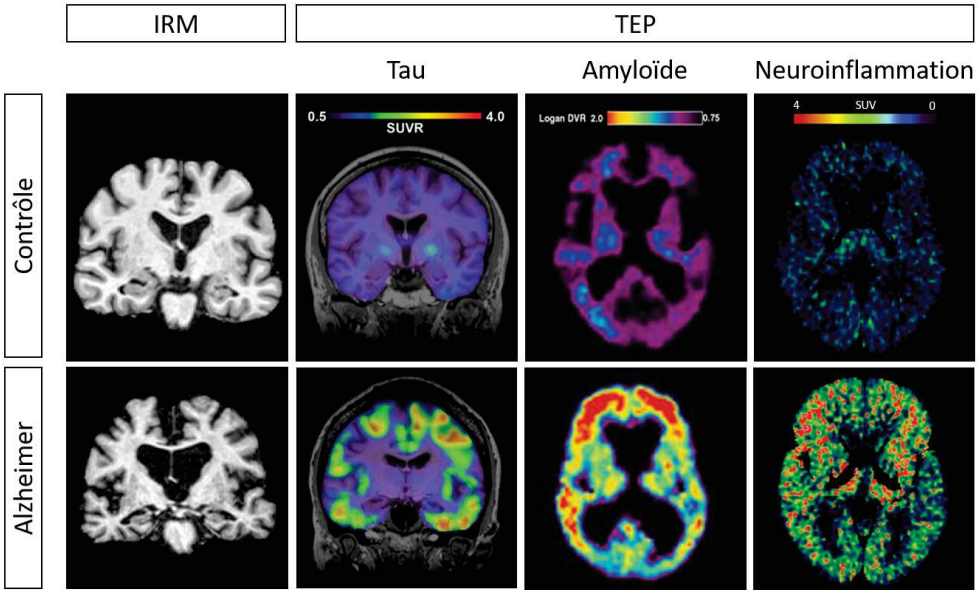


FIGURE 1.7 – **Biomarqueurs de la MA** - L'utilisation de l'IRM et de la TEP permettent de distinguer les patients atteints de la MA des sujets contrôles. L'IRM permet d'évaluer l'atrophie corticale et de mesurer l'augmentation du volume des ventricules. La représentation en fausses couleurs de la TEP permet de détecter une augmentation des différents facteurs. L'agrégation de l'amyloïde est visualisée grâce au ^{11}C-PIB. La neuroinflammation est marquée à l'aide du ^{11}C-PK11195. Adapté de [Ikonomovic et al., 2012; Zimmer et al., 2014; Schöll et al., 2017; Ledig et al., 2018].

pathologie, les patients pré-MA (patients MCI) et les sujets sains [Lleó et al., 2019]. De plus, des biomarqueurs circulants permettant l'étude du niveau de neuroinflammation émergent. Dans le LCR, l'étude de la concentration en YKL-40, une glycoprotéine sécrétée par les cellules gliales en cas d'inflammation, permettrait non seulement de différencier les patients MA des contrôles, mais aussi de prédire la progression de la pathologie entre les stades prodromaux et tardifs [Baldacci et al., 2017]. Cependant, la neuroinflammation étant un mécanisme commun aux maladies neurodégénératives, ce biomarqueur n'est pas spécifique de la MA [Hampel et al., 2020]. Enfin, l'évaluation d'autres biomarqueurs circulants plus spécifiques de la microglie tels que sTREM2 commencent à émerger et permettraient de distinguer les patients MCI et MA dès les stades précoces [Nordengen et al., 2019].

La recherche de biomarqueurs de la MA dans le sang est encore balbutiante. L'accès aux échantillons sanguins étant plus simple et moins invasif qu'une ponction lombaire, beaucoup d'efforts sont placés dans l'étude plus précise de ces biomarqueurs [Simrén et al., 2020]. L'évolution des concentrations plasmatiques en Aβ, T-Tau et YKL-40 permettrait de refléter la pathologie mais les études restent à confirmer de manière longitudinale. Au niveau périphérique, un autre biomarqueur émerge : les chaînes légères des neurofilaments (NfL). Ces protéines sont des composants du cytosquelette majoritairement présents dans les axones myélinisés de grand diamètre. De manière intéressante, les concentrations de NfL dans le LCR et dans le plasma corrèlent parfaitement faisant

de ces protéines des biomarqueurs sanguins de choix. Chez les patients atteints de forme familiale de MA, il existe déjà au stade précoce asymptomatique un lien fort entre la concentration en NfL et la pathologie [Plescher et al., 2018]. De plus, une méta-analyse récente a permis de révéler que la concentration plasmatique de NfL était inversement corrélée avec le score MMSE qui reflète le statut cognitif des patients [Jin et al., 2019]. Enfin, même si De Wolf et al. [2020] démontrent que des niveaux plasmatiques élevés en NfL sont aussi associés à d'autres types de démences, ils indiquent que l'élévation des concentrations pourrait être retrouvée dans le plasma des patients jusqu'à 10 ans avant le diagnostique de MA. Ces auteurs en concluent que, bien que non spécifique, la concentration plasmatique en NfL combinée avec d'autres biomarqueurs pourrait être utile pour le diagnostic et le suivi de la progression de la MA.

Le problème majeur des biomarqueurs actuels reste ainsi leur spécificité. Dans la plupart des cas, ils ne sont pas purement spécifiques de la MA mais s'appliquent à différentes maladies neurodégénératives. En définitive, avec les connaissances actuelles, il est peu probable de développer un biomarqueur unique de la MA. Il est plus envisageable d'obtenir un nombre de biomarqueurs qui, combinés, permettront d'établir le diagnostic avec une bonne précision. Les futurs biomarqueurs doivent reposer sur des techniques facilement accessibles et peu coûteuses pour permettre un diagnostic pour tous.

B.4.ii Essais thérapeutiques, des échecs et de l'espoir

À l'heure actuelle, les principaux traitements prescrits contre la MA sont des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase (AChE). Ils reposent sur le fait que les patients présentent une diminution de la concentration en acétylcholine (ACh) provoquée par la dégénérescence des neurones cholinergiques. Cette stratégie thérapeutique a pour objectif de diminuer la dégradation de l'ACh en inhibant son enzyme de dégradation, l'AChE. Dans l'ensemble, les études démontrent que l'amélioration des symptômes est faible et que les patients voient leur fonctions cognitives continuer à décliner [Doody et al., 2001; Courtney et al., 2004; Joe and Ringman, 2019]. Ces médicaments n'arrêtant pas la progression de la MA, il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies.

Les molécules actuellement en essai thérapeutique (voir Table 1.2) sont basées sur les mécanismes connus de la MA. Une majorité des stratégies thérapeutiques sont concentrées sur la cascade amyloïde. Quelle que soit la stratégie, l'objectif est de limiter la production de l'Aβ, son agrégation ou d'augmenter sa clairance. Un très grand nombre de ces molécules ont malheureusement échoué [Mullane and Williams, 2020]. Les explications de ces échecs peuvent être multiples : (i) cibler seulement l'amyloïde n'est pas suffisant pour une pathologie aussi complexe que la MA, (ii) ces essais ont été conduits à des stades trop tardifs où les dommages étaient déjà irréversibles et (iii) l'Aβ joue des rôles physiologiques importants qui n'ont pas été pris en considération. Malgré les nombreux échecs passés, en 2019, la moitié des essais thérapeutiques étaient encore tournés vers l'hypothèse amyloïde. Toutefois, la tendance évolue et, en 2020, avec l'émergence

Mécanisme	**Molécule**	**Phase**	**Résultats**
Fonctions neuronales			
Inhibe AChE	Tacrine	-	Retiré du marché
	Donepezil	-	Prescrit
	Rivastigmine	-	Prescrit
	Galantamine	-	Prescrit
Antagoniste NMDA	Memantine	-	Prescrit
Antagoniste 5HT-6	ABT-354	I	**En cours**
	Interpirdine	III	**En cours**
Antagoniste des récepteurs βAdr	Carvedilol	II	**En cours**
Amyloïde β			
Anticorps anti Aβ	Solanezumab	III	Non efficace
	Bapineurumab	III	Non efficace
	Aducanumab	III	Non efficace
	BAN24010	III	**En cours**
	Crenezumab	III	**En cours**
Inhibe l'Aβ cérébral ($\nearrow$ autophagie)	Nilotinib	II	**En cours**
	Bexarotene	II	**En cours**
Inhibe l'agrégation de l'Aβ	Tramiprosate	II	Non efficace
	ELND005	II	**En cours**
Inhibe la γ-sécrétase	Semagacestat	III	Effets néfastes
	Avagacestat	II	Non efficace
Inhibe l'α-sécrétase	Pinitol	II	**En cours**
Active l'α-sécrétase	Acitretin	II	**En cours**
	Bryostatin	II	**En cours**
Inhibe BACE1	Verubecestat	III	Effets néfastes
	Lanabecestat	III	Non efficace
	Elenbecestat	III	**En cours**
	CNP520	II/III	**En cours**
Neuroinflammation			
Inhibe GSK-3β	Masatinib	II/III	**En cours**
	Tideglusib	II	**En cours**
Inhibe Lp-PLA2	Rilapladib	II	**En cours**
Active SIRT1	Resveratrol	II	**En cours**
Active TREM2	AL002	I	**En cours**
Bloque TNF-α	XPro159	Ib	**En cours**

TABLE 1.2 – **Principaux essais thérapeutiques dans la MA** - Adapté de [Husna Ibrahim et al., 2020; Hampel et al., 2020; Mullane and Williams, 2020].

de nouvelles cibles thérapeutiques ce chiffre à diminué de 40%.

Face aux nombreux échecs des traitements centrés sur l'amyloïde, le développement de molécules ciblant Tau ou la neuroinflammation voit le jour. Plusieurs molécules en cours de test visent à moduler la neuroinflammation de manière globale (voir Table 1.2). Néanmoins, les effets de la neuroinflammation peuvent dépendre du stade de la pathologie [Hampel et al., 2020], il est donc crucial de prendre en compte le stade d'inclusion des patients pour ces molécules.

Avec une pathologie multifactorielle comme la MA, l'idée de développer un médicament multi-cibles émerge. Plusieurs MTDLs (multi targeted-directed ligand) sont ainsi en cours de développement au stade pré-clinique [Hatat et al., 2019].

B.5 Modèles d'étude de la MA

La caractérisation précise de la pathologie est un pré-requis pour le développement de nouvelles thérapies et l'identification de nouveaux biomarqueurs. Afin de décortiquer les mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer, les chercheurs se basent sur des modèles à la fois *in-vivo* et *in-vitro*.

B.5.i Les modèles animaux

Plus de 200 modèles sont actuellement disponibles pour l'étude de la MA (Alzforum), certains sont plus originaux que d'autres (voir Publication 1 - Annexe A [Hemonnot et al., 2019]). La plupart des recherches se basent sur des modèles murins portant diverses mutations retrouvées chez les patients atteints de cette maladie. Ils peuvent être catégorisés en trois grandes familles :

- Les modèles Tau basés uniquement sur des mutations ponctuelles de la protéine Tau induisant son hyperphosphorylation ;
- Les modèles amyloïdes purs basés sur des mutations impactant l'APP et/ou les enzymes impliquées dans sa dégradation : les préséniline-1 et 2 (PS1, PS2) ;
- Les modèles mixtes porteurs de mutations affectant à la fois la protéine Tau mais aussi l'amyloïde, le modèle le plus courant étant le modèle 3xTg.

En plus des différentes mutations et combinaison de mutations, il existe différents types de souris modèles. D'une part les souris transgéniques sur-exprimant ces mutations (ex. $APP^{swe}/PS1^{dE9}$) et d'autre part les souris *knock-in* (KI) chez qui l'expression de la protéine mutée est contrôlée par le promoteur endogène (ex. APP^{NL-F}).

La partie suivante s'intéresse plus en détail au modèle principal utilisé dans cette thèse.

$\mathbf{APP^{swe}/PS1^{dE9}}$

De nombreux modèles murins différents sont appelés APP/PS1, du moment qu'il expriment *a minima* une mutation sur les gènes de l'APP et de la PS1. Ils représentent les modèles d'étude de la MA les plus utilisés. Dans notre cas nous traiterons du modèle $APP^{swe}/PS1^{dE9}$ (appelé, par simplification, APP/PS1 dans le reste du document) développé par le Dr Jankowsky [Jankowsky et al., 2004]. Dans ce modèle, les souris transgéniques sur-expriment, sous le contrôle du promoteur prion, l'APP humaine portant la mutation familiale Swedish (KM670/671NL) ainsi que la PS1 humaine portant une délétion de l'exon 9, ce modèle est donc purement amyloïde. Avec l'âge, ce modèle reproduit un certain nombre de caractéristiques de la MA (Figure 1.8). Dans ce modèle, la pathologie se développe d'abord au niveau cortical puis au niveau hippocampique.

Une partie de ma thèse a été consacrée à la caractérisation du développement des marqueurs de la MA dans ce modèle et a fait l'objet d'une publication (Annexe B, [Hemonnot-Girard et al., 2021]). En particulier, dans ce travail, nous avons étudié l'évolution de différents paramètres neuroinflammatoires à différents stades de la pathologie et nous avons analysé l'impact du sexe.

Chez les souris APP/PS1, on observe une **sur-production d'Aβ** dès 3 mois [Volianskis et al., 2010], l'apparition de quelques plaques à 4 mois [Hamilton and Holscher, 2012; Kelly et al., 2017; Hemonnot-Girard et al., 2021] dont le nombre augmente considérablement à 6 mois [Jankowsky et al., 2004; Janota et al., 2015] puis avec le décours de la pathologie [Hemonnot-Girard et al., 2021]. La présence d'angiopathie amyloïde est détectée dès 4 mois [Garcia-Alloza et al., 2006] et suivie, à 5 mois, par une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [Kelly et al., 2017] s'accompagnant notamment d'une perturbation des péricytes [Janota et al., 2015].

De manière intéressante la **réaction microgliale** pourrait se mettre en place dès 4 mois. Cependant, à cet âge, les résultats fluctuent d'une étude à l'autre : alors que Hoeijmakers et al. démontrent une augmentation du nombre de microglies sans changement de leur complexité, dans notre étude nous n'avons observé aucun changement du nombre de microglies [Hemonnot-Girard et al., 2021]. À ce stade, cette hyperplasie potentielle ne semble pas induire de neuroinflammation forte puisqu'aucune cytokine classique (IL-6, IL-1β, IL-10, TNFα) n'est sur-exprimée [Agostini et al., 2020] et que seule la chémokine *Cxcl10* est augmentée au niveau transcriptomique [Hemonnot-Girard et al., 2021]. Les résultats étant peu nombreux et controversés à ces stades précoces, au cours de ma thèse j'ai caractérisé plus en détail la réaction microgliale à 4 mois (voir Résultats A.2.ii). L'astrogliose quant à elle se met en place de manière plus tardive, à 6 mois. Elle se caractérise par une augmentation de la réaction astrocytaire révélée par l'augmentation en GFAP, qui progresse avec le décours de la pathologie [Janota et al., 2015; Hemonnot-Girard et al., 2021]. Ces réactions microgliales et astrocytaires s'installent ensuite avec la progression de la MA, avec, à partir de 8 mois, une hyperplasie et de nombreux changements transcriptomiques [Hemonnot-Girard et al., 2021].

Comme chez les patients, des **altérations synaptiques** se développent avec la pathologie. Dès 6 mois, une diminution du nombre des épines dendritiques ainsi que la modification de leur forme peuvent être associées à des défauts de LTP [Viana da Silva et al., 2016].

Enfin, de nombreuses études ont cherché à caractériser les **défauts comportementaux** (locomotion, apprentissage, mémorisation, etc.) chez ces souris. L'âge d'apparition de l'hyperlocomotion est encore débattu. Alors que différents groupes s'accordent à dire qu'il n'existe pas d'hyperlocomotion chez ces souris que ce soit à 4 mois [Bonardi et al., 2011] ou à 7 mois [Lalonde et al., 2004; Sierksma et al., 2014], d'autres groupes démontrent une faible augmentation de l'activité locomotrice à 5 et 6 mois [Kelly et al., 2017; Da Silva et al., 2016]. Un défaut dans la mise en place de l'apprentissage de peur se met aussi en place à 4 mois [Agostini et al., 2020], il mène à des défauts de rétention dans les mêmes tâches [Bonardi et al., 2011]. Quelque soit le test (V-maze [Aso et al.,

2012], Y-maze [Bonardi et al., 2011; Agostini et al., 2020], Piscine de Morris (MWM) [Zhang and Wang, 2018], Positionnement d'objet (OIP) [Bonardi et al., 2011]), aucun défaut d'apprentissage spatial ni de rétention ne sont caractérisés à 4 mois, et ce n'est que plus tard que ces souris développent ce type de défauts cognitifs. Entre 6 et 7 mois, de nombreux défauts d'apprentissage (active avoidance [Aso et al., 2012], OIP [Da Silva et al., 2016], Barnes Maze [Reiserer et al., 2007]) et de rétention (Y-maze [Da Silva et al., 2016], V-maze [Aso et al., 2012]), ainsi qu'une diminution de l'anxiété ont été mis en évidence [Lalonde et al., 2004; Sierksma et al., 2014; Reiserer et al., 2007]. Enfin, à 10 mois, on observe des problèmes d'apprentissage et de rétention dans le test de la Piscine de Morris et le test de construction du nid [Janus et al., 2015].

Comme chez l'Homme, dans ce modèle, les caractéristiques de la MA sont influencées par le sexe. Notamment, aux âges intermédiaires, les femelles présentent une plus forte densité en plaques amyloïdes qui ne s'accompagne cependant pas d'une neuroinflammation plus marquée [Hemonnot-Girard et al., 2021]. Pour plus d'informations sur l'effet sexe voir Publication 1 - Annexe A [Hemonnot et al., 2019], Publication 2 - Annexe B [Hemonnot-Girard et al., 2021] et section A.2.ii.

Pour étudier plus finement l'impact de la microglie dans la MA, le modèle APP/PS1 peut être croisé avec des souris rapportrices $CX_3CR_1^{+/eGFP}$. L'introduction de ce rapporteur microglial induit une haplodéficience en CX_3CR_1, mais dans une étude de caractérisation nous avons validé que cette modification n'influe que peu le développement de la MA (Publication 2 - Annexe B, [Hemonnot-Girard et al., 2021]).

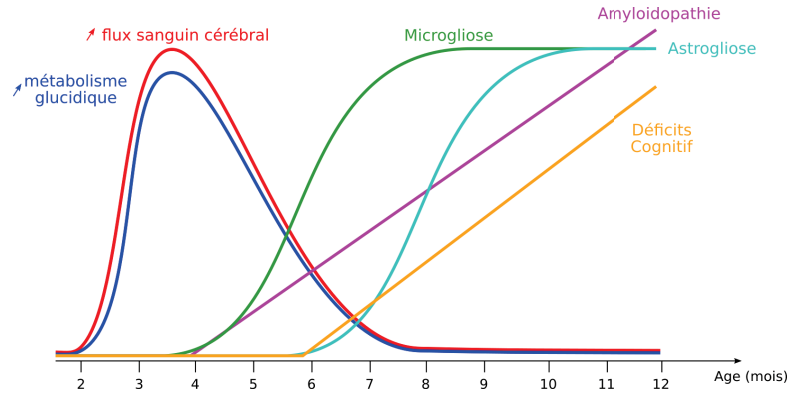


FIGURE 1.8 – **Cinétique d'apparition des principales caractéristiques de la MA dans le modèle APP^{swe}/PS1^{dE9}** - Des altérations précoces transientes du métabolisme glucidique et du flux sanguin cérébral se mettent en place durant la phase prodromale de la MA. La microgliose s'initie de manière concomitante avec la surproduction d'Aβ induisant par la suite l'astrogliose et finalement les défauts cognitifs.

APP^{NL-F}

Le modèle APP^{NL-F} a été crée en 2014 par le groupe du Dr Saido [Saito et al., 2014]. Contrairement aux modèles transgéniques classiques, ce modèle introduit les mutations par une approche *Knock-In* (KI) permettant une expression de la protéine mutée sous le contrôle du promoteur endogène. La Figure 1.9 représente la localisation des différentes mutations introduites. En bref, la protéine murine a été humanisée par mutations ponctuelles (orange) puis différentes mutations de formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont été insérées. En bleu, les mutations de la forme familiale Swedish ($^{670/671}$KM $\rightarrow$ NL) et en vert la mutation de la forme familiale Iberian (^{716}I $\rightarrow$ F).

Pour différentes raisons, ce modèle semble plus proche de la pathologie humaine : il s'affranchit des biais dû à la sur-expression, non seulement des protéines amyloidogéniques mais aussi de leur produits dérivés et présente un développement relativement lent des caractéristiques de la pathologie (Figure 1.10).

Dans le même temps que les les APP^{NL-F}, l'équipe du Dr Saido a crée les souris APP^{NL-G-F} chez qui une troisième mutation familiale a été introduite et qui conduit à un développement plus rapide de la pathologie [Saito et al., 2014]. Contrairement aux APP^{NL-G-F}, les APP^{NL-F} restent très peu étudiées. Dans les paragraphes suivants je présenterai une analyse exhaustive des quelques publications sur ce modèle. Il faut noter que les études ont toutes été conduites sur des souris homozygotes pour les mutations et que la cinétique d'apparition des marqueurs de la MA est encore très largement débattue.

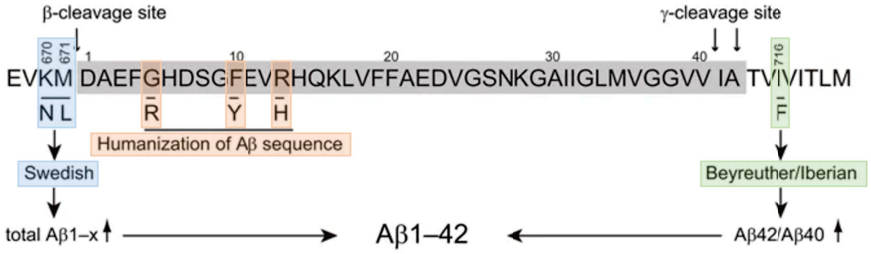


FIGURE 1.9 – **Mutations sur le gène de l'APP pour créer le modèle APP^{NL-F}** - Les mutations surlignées en orange permettent d'humaniser la séquence de l'Aβ puis des mutations ponctuelles ont été insérées : en bleu les mutations de la forme familiale Swedish et en vert, la mutation de la forme familiale Iberian. Adapté de [Saito et al., 2014].

La **surproduction d'amyloïde** β, bien que définie dès 2 mois dans l'étude originale [Saito et al., 2014] est controversée. En effet, de Vidania et al. ne détectent aucune espèce d'Aβ, soluble ou insoluble, chez des animaux de 3 mois. La cinétique d'apparition des plaques diffuses est aussi sujette à débat : elle pourrait se mettre en place dès 5 mois [Saito et al., 2014; Nakazono et al., 2017] mais d'autres études à 6 et 7 mois démontrent

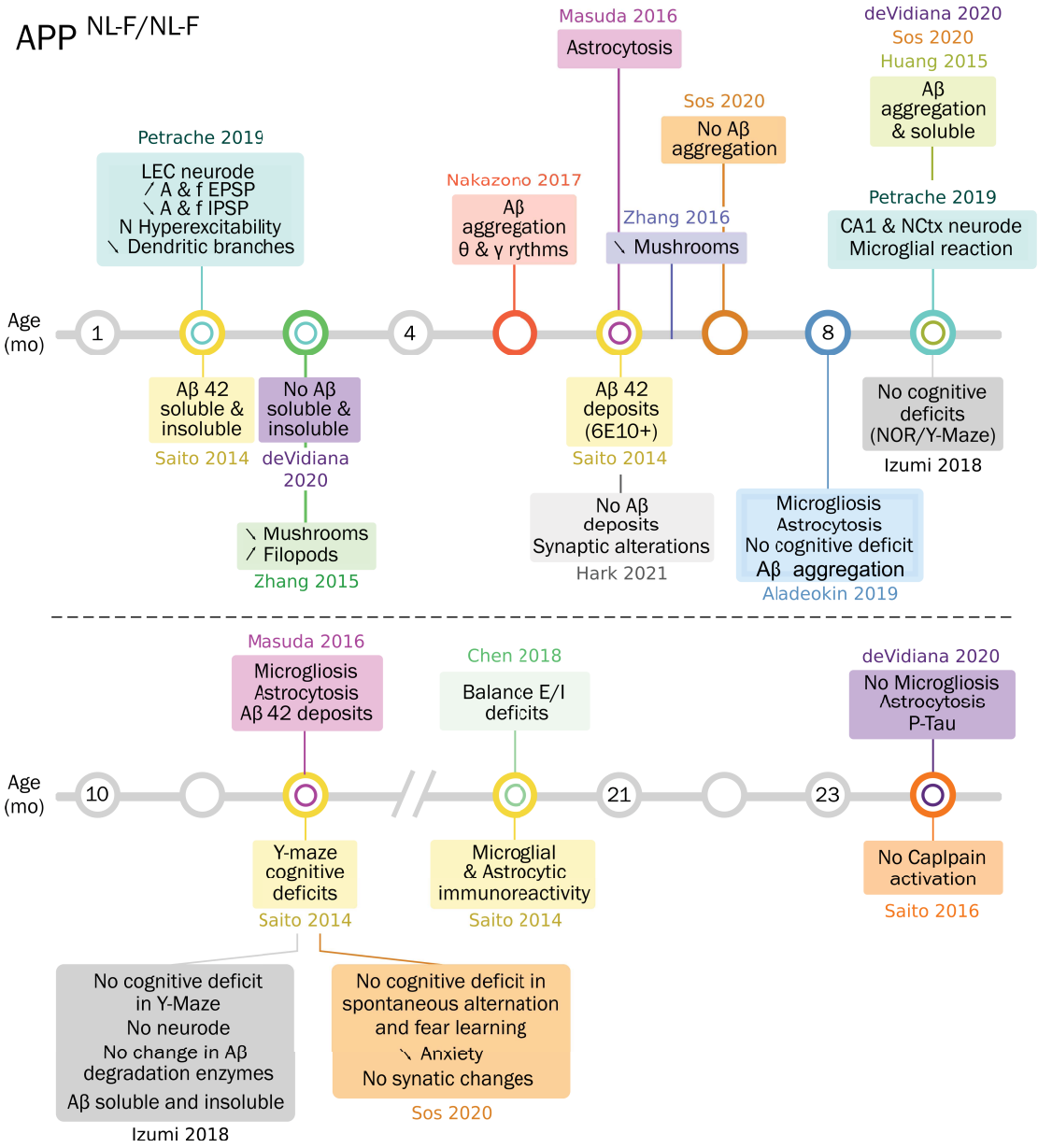


FIGURE 1.10 – **Analyse bibliographique du développement des symptômes de la MA dans le modèle APP$^{NL-F/NL-F}$** - LEC pour Lateral Enthorinal Cortex, NCtx pour Néocortex. Basé sur la bibliographie [Saito et al., 2014; Zhang et al., 2015; Saito et al., 2016; Masuda et al., 2016; Zhang et al., 2016; Huang et al., 2016; Nakazono et al., 2017; Izumi et al., 2018; Chen et al., 2018; Petrache et al., 2019; Aladeokin et al., 2019; Sos et al., 2020; de Vidania et al., 2020; Hark et al., 2021].

l'absence de ces dépôts [Hark et al., 2021; Sos et al., 2020]. Pour autant, l'ensemble des publications s'accorde à dire qu'à l'âge de 9 mois ces souris présentent une agrégation amyloïde dans le cortex [Huang et al., 2016; Aladeokin et al., 2019; de Vidania et al., 2020; Sos et al., 2020].

La cinétique de mise en place de la **réaction gliale** est elle aussi encore floue. Alors que différentes études de la surface IBA1 mettent une évidence une réaction microgliale à partir de 8 mois [Aladeokin et al., 2019] puis confirmée à 12 mois [Masuda et al., 2016], par la même technique, de Vidania et al. n'observent aucune microgliose à 24 mois. Il serait intéressant de caractériser cette microgliose plus en détail à fin de déterminer si, comme chez les patients, elle se met en place de manière bi-phasique. L'astrogliose, quant à elle, est retrouvée dès 5 mois [Masuda et al., 2016] et confirmée aux stades plus tardifs de 8, 12 et 24 mois [Aladeokin et al., 2019; Masuda et al., 2016; de Vidania et al., 2020].

Dans ce modèle, les **défauts cognitifs** sont encore à caractériser. Alors que Saito et al. observent des défauts de mémoire de travail à 12 mois dans le Y-Maze, Izumi et al. eux, n'observent aucun déficit cognitif dans ce même test au même âge. De plus, à un âge encore plus tardif de 15 mois, Sos et al. montrent que ces souris ne présentent pas de défauts de mémoire de travail mais une diminution de leur anxiété .

La plupart des études présentées ici ont été conduites chez le mâle mais certaines études mélangent mâles et femelles. Un effet du sexe dans ce modèle ne doit cependant pas être exclu, puisque ce facteur semble modifier l'apparition des symptômes dans le modèle APP^{NL-G-F}, son équivalent triple transgénique [Masuda et al., 2016].

La caractérisation de ce modèle prometteur est donc un pré-requis important pour l'étude des stades précoces d'initiation et de développement de la MA. Une partie de ma thèse a ainsi été consacrée à la caractérisation du modèle APP^{NL-F}. Nous avons étudié l'apparition des troubles cognitifs (apprentissage et mémorisation, locomotion, anxiété), des syndromes métaboliques (soif, poids), la réaction gliale (du point de vue histologique et transcriptomique), l'amyloïdose (en histologie, ELISA et Western Blot). Nous avons choisi d'étudier ces caractéristiques dans les trois génotypes (sauvages, hétérozygotes et homozygotes), à trois âges différents (3, 6 et 9 mois) et nous avons comparé les mâles et les femelles. Ces données sont encore en cours d'acquisition et pour des questions de fluidité du manuscrit, ces résultats ne seront pas présentés dans la partie Résultats.

Avantages et limites des modèles animaux

Les modèles animaux sont très utiles pour la caractérisation de mécanismes complexes de la MA. En effet, plus intégrés que les modèles *in-vitro*, il permettent de décortiquer des interactions entre différents types cellulaires ou des voies de signalisation complexes. Cependant, on considère que les échecs des essais thérapeutiques sont en grande partie dû à la différence entre les modèles murins et la pathologie humaine. D'une part car l'étude de modèles basés sur des mutations génétiques ne représentant que les formes familiales de la MA, soit seulement 1% des patients et d'autre part car ils réduisent la

pathologie à un seul facteur, souvent l'hypothèse amyloïde, alors que cette maladie est multifactorielle.

Pour palier à ces limitations, des initiatives se mettent en place pour développer de nouveaux modèles plus adaptés et plus performants.

B.5.ii Les modèles plus proches de l'Homme

Puisque les modèles animaux de la MA comportent un certain nombre de désavantages (Table 1.3), la recherche s'est tournée vers l'utilisation et le développement de modèles plus translationnels.

Quoi de plus translationnel que des **échantillons humains** ? L'utilisation d'échantillons de cerveaux post-mortem a permis de valider certaines dérégulations observées dans les modèles murins. Cependant, ce type d'échantillons ne sont utiles que pour valider des hypothèses aux stades tardifs, et ne permettent en aucun cas d'aider à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Leur utilisation est donc très informative mais limitée. Le recours aux fluides de patients, qu'il s'agisse de LCR ou de sang, permet de palier à ces problèmes. Cette fois-ci, les échantillons permettent d'avancer dans la découverte de biomarqueurs des stades précoces mais ils sont peu utiles pour la compréhension de la pathologie ou la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Alors que le LCR représente directement l'état du SNC, son prélèvement est très invasif et reste peu utilisé. À l'inverse, les échantillons sanguins sont très faciles d'accès mais sont peu spécifiques de l'état cérébral et les informations qu'ils apportent peuvent être biaisés par une inflammation périphérique par exemple. Il est donc nécessaire de combiner les approches pour être le plus spécifique possible.

Le développement de nouveaux outils permet de s'affranchir des inconvénients des échantillons humains "classiques" [Hirbec et al., 2020]. Depuis une quinzaine d'année l'utilisation des cellules pluripotentes induites issues de patients (**hiPSC**) fait son essor ; ces cellules représentant un nouvel axe pour étudier la pathologie. Grâce à un cocktail de facteurs de reprogrammation, des fibroblastes ou des cellules sanguines de patients sont dé-différenciés en cellules souches pluripotentes [Takahashi et al., 2007]. Ces cellules peuvent ensuite être différenciées en composants du SNC : neurones [Takahashi et al., 2007; Hu and Zhang, 2009], oligodendrocytes [Hu et al., 2009], astrocytes [Krencik et al., 2011] ou plus récemment microglies [Takata et al., 2017; Abud et al., 2017; Quarta et al., 2019]. Cet outil permet donc d'étudier l'impact de mutations ou de variants sporadiques sur ces types cellulaires. Ce modèle permet non seulement de décortiquer des mécanismes complexes, dépendants des patients, mais aussi de tester des molécules candidates de manière plus intégrée.

Réduire le SNC à un seul élément ne permet toutefois pas de comprendre les interactions inter-cellulaires complexes de ce système. La plupart des pathologies étant multi-factorielles, les communications cellulaires semblent cruciales pour le développement de thérapies innovantes et efficaces. La combinaison de ces différents types cellulaire d'hiPSC a permis de créer des **cultures tridimensionnelles** ou "mini-cerveaux"

[Hirbec et al., 2020]. L'utilisation de ce type de modèles est encore balbutiante mais permet de mimer, *in-vitro*, la mise en place de pathologies comme la MA [Zhang et al., 2014; Raja et al., 2016; Gonzalez et al., 2018; Penney et al., 2020; Hernández-Sapiéns et al., 2020]. Par ailleurs, bien que plus proches de l'*in-vivo*, ces modèles présentent leurs propres limites : ils reflètent principalement les stades tardifs de la pathologie, et sont extrêmement coûteux à la fois en temps et en ressources.

	Avantages	**Inconvénients**
Modèles animaux		
APP/PS1	Bien Caractérisé	Uniquement amyloïde Formes Familiales Sur-Expression
APP^{NL-F}	Expression sous couvert du promoteur endogène	Uniquement amyloïde Formes Familiales
Modèles *In-vitro*		
hiPSCs	Cellules humaines Analyse des formes sporadiques	Types cellulaires uniques Fonctions différentes d'in-vivo
Mini-brain	Cellules humaines Communication cellulaire	Très long et coûteux
Échantillons humains		
Post-mortem LCR/Sang	Humain Stade précoces Biomarqueurs	Stades tardifs uniquement Pas adapté à la découverte de cibles Peu de spécificité cellulaire

TABLE 1.3 – **Avantages et Inconvénients des approches expérimentales pour étudier la MA**

Bien que chacun des modèles ait son intérêt, ils comportent tous des limites et biais. Connaître les limites des modèles utilisés est important pour tempérer les résultats obtenus et renforcer les hypothèses. À l'avenir, les études devraient systématiquement et ouvertement statuer des limites et biais de leur(s) modèle(s). Dans la mesure du possible, elles devraient combiner des approches *in-vivo*, *in-vitro* et humaines pour permettre d'obtenir des données robustes. Ces approches multi-modèles complexes permettront d'accroître les connaissances tant pour la physiopathologie de la MA que pour la recherche de biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques.

B.6 Les enjeux du stade précoce

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace ni de biomarqueur spécifique de la MA. Pourtant leur nécessité n'est plus à prouver. Alors qu'il sera sûrement impossible

de reverser les effets de la maladie au stade tardif on peut espérer qu'en intervenant au stade précoce il sera possible de limiter la progression de la maladie ou d'améliorer la qualité de vie des patients et aidants.

Dans les modèles animaux, le stade précoce a souvent été négligé car les déficits y sont plus subtils, plus complexe et donc difficile à caractériser. Néanmoins, des études récentes en TEP chez l'Homme montrent des différences entre les stades précoces et tardifs de la MA que ce soit dans l'imagerie de Tau [Schöll et al., 2017] ou dans l'imagerie de l'inflammation [Fan et al., 2017].

La complexité d'analyse des stades précoces repose sur le fait que certaines altérations, de bas grades, sont difficiles à mettre en évidence. De plus, certaines altérations précoces peuvent être éphémères. Dans les modèles animaux de la MA, des effets précoces transitoires tels que des modifications du flux sanguin cérébral [Guo et al., 2019] et du métabolisme glucidique [Li et al., 2016] associés à une inflammation périphérique [Shi et al., 2017] ont été mis en évidence. Ces altérations pourraient modifier l'état inflammatoire du SNC et déclencher une activation microgliale engendrant un premier pic d'activation indépendant de l'amyloïde. Chez l'Homme, cette théorie métabolique émerge aussi [Muddapu et al., 2020]. Ainsi, un ensemble de pistes nouvelles émergent quant aux mécanismes physiopathologiques à l'oeuvre aux stades précoces de la maladie. Une partie de ces pistes telles que le stress oxydant ou la concentration intracellulaire en fer sont décrites en détail dans la Publication 1 en Annexe A [Hemonnot et al., 2019].

L'existence d'effets précoces brefs démontrent l'intérêt particulier de se placer à ces stades pré-symptomatiques pour étudier les facteurs initiateurs de la pathologie. Comme ces effets précoces peuvent disparaître par la suite, ignorer le stade précoce c'est perdre totalement tout un champ de connaissances.

C Les Microglies dans la maladie d'Alzheimer

Bien que leur implication précise dans le développement et la progression de la MA soit toujours le sujet d'intenses débats, l'intérêt de l'étude des microglies dans la MA est aujourd'hui communément admis (Voir Publication 1 - Annexe A [Hemonnot et al., 2019]).

C.1 Les facteurs de risques génétiques microgliaux de la MA

Outre leurs différentes fonctions décrites ci-dessus, les microglies semblent fortement liées à l'apparition de la MA. L'avènement et la "démocratisation" des techniques de séquençage à haut débit a en effet permis de démontrer que certains gènes microgliaux peuvent être impliqués dans le développement de la MA. Ces facteurs de risques sont principalement cruciaux pour l'étude et la compréhension des formes sporadiques de la pathologie.

C.1.i Identification des facteurs de risques génétiques

Les études d'association pan-génomique (GWAS) sont utilisées pour analyser simultanément des millions de variants génétiques dans des dizaines voire centaines de milliers d'individus. Le but de ces études est d'identifier des variants génétiques rares associés avec un trait particulier ou une pathologie. Le schéma d'étude de GWAS le plus utilisé pour la MA est la comparaison de patients atteints de la MA et des personnes âgées non démentes de la même population. Ces études permettent de mettre en évidence des régions du génome (loci) qui sont associées à cette pathologie. Ces loci pouvant contenir plusieurs gènes, il faut être prudent dans l'interprétation de ces associations [Efthymiou and Goate, 2017]. En 2013, une méta-analyse d'études GWAS reprenant plus de 70 000 cas de la MA, a permis d'identifier 20 loci associés à cette pathologie [Lambert et al., 2013]. Dans l'ensemble, ces études ont mis en évidence une possible implication de plus de 25 gènes microgliaux dans la MA [Verheijen and Sleegers, 2018]. Il s'agit de gènes qui sont exprimés dans la microglie que ce soit de manière spécifique ou non (Figure 1.11) [Mhatre et al., 2015]. Ces études complexes suggèrent donc que, dans les LOAD, la microglie est directement liée à l'initiation de la pathologie et ne représente pas seulement une réponse aux protéinopathies ou à la neurodégénérescence [Sims et al., 2017].

Cependant, la plupart des gènes mis en avant doivent encore être validés et leur implication fonctionnelle reste encore à élucider [Bellenguez et al., 2020].

C.1.ii Des cibles microgliales sous les feux des projecteurs

Parmi l'ensemble des facteurs de risques génétiques de la MA, certains sont plus étudiés que d'autres. Alors que l'apolipoprotéine E (ApoE) est étudiée depuis longtemps, d'autres cibles, comme le récepteur TREM2, sont récemment devenues d'un grand intérêt. Ces deux protéines semblent jouer des rôles importants et peut-être synergiques dans le développement de la MA.

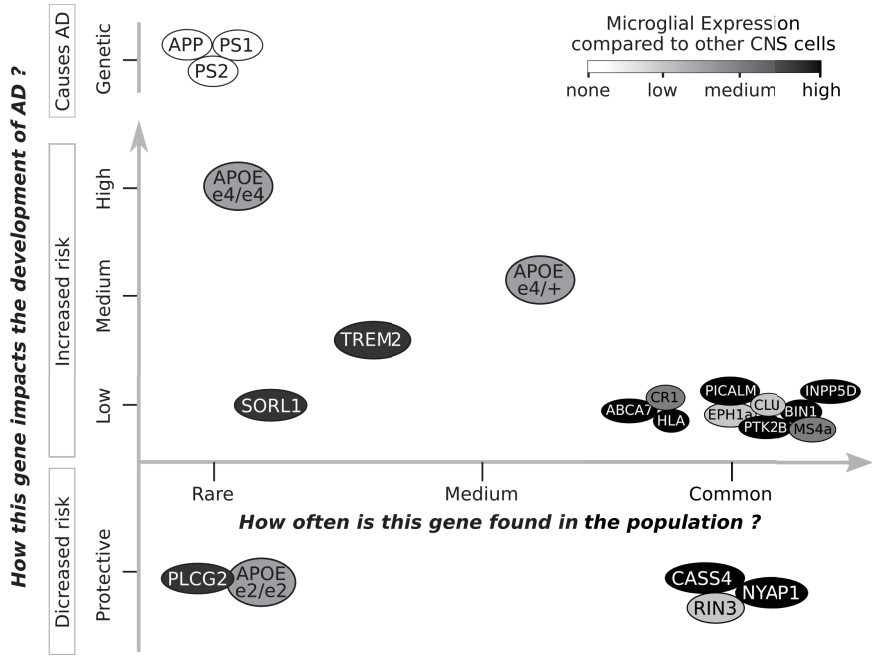


FIGURE 1.11 – **Facteurs de risques génétiques de la MA et leur spécificité d'expression microgliale** - Les mutations sur l'APP et PS1/2 sont responsables du développement des formes familiales de la MA. Les formes sporadiques pourraient se développer suite à l'expression ou la mutation de différents facteurs de risque génétiques. Une grande partie de ces facteurs de risque génétiques sont exprimés par la microglie. Certains facteurs de risques comme TREM2 sont exclusivement microgliaux (Noir) tandis que d'autres, comme CLU, RIN3 ou EPH1a (Gris clair), sont plus faiblement exprimés dans les microglies. Adapté de [Mhatre et al., 2015; Karch and Goate, 2016; Gosselin et al., 2017; Sims et al., 2017; Yeh et al., 2017; Kamboh, 2018]

ApoE, au delà de l'Aβ, un modulateur de l'activité microgliale

L'Apolipoprotéine E (ApoE) est impliquée dans le transfert du cholestérol et des lipides entre les cellules. Dans le SNC, elle est exprimée principalement par les astrocytes mais peut-être retrouvée dans les microglies. Chez l'Homme, ApoE est présente sous trois allèles : $\varepsilon 2$, $\varepsilon 3$ et $\varepsilon 4$. L'allèle rare ApoE-$\varepsilon 2$ est plutôt protecteur contre la MA, l'allèle le plus commun, ApoE-$\varepsilon 3$ semble neutre [Serrano-Pozo et al., 2015], alors que le dernier, ApoE-$\varepsilon 4$, représente le facteur de risque le plus important de développer la MA. En effet, la présence d'une seule copie d'ApoE-$\varepsilon 4$ augmente de 3 fois la probabilité de développer la MA et la présence deux copies l'augmente de 9 fois [Corder et al., 1993].

L'implication des allèles d'ApoE dans l'initiation et la progression de la MA est encore peu comprise. Les patients ApoE-$\varepsilon 4$ présentent plus de plaques et d'oligomères que les porteurs de l'allèle ApoE-$\varepsilon 3$ [Hashimoto et al., 2012; Koffie et al., 2012; Schmechel et al., 1993; Tiraboschi et al., 2004]. Les différents allèles d'ApoE ont des effets différents sur des processus impliqués dans la pathologie amyloïde, que ce soit l'oligomérisation et la formation de plaques d'Aβ [Hashimoto et al., 2012; Naslund Jan et al., 1995; Strittmatter et al., 1993] ou la clairance du peptide [Castellano et al., 2011; DeMattos et al., 2004].

Le rôle spécifique de l'ApoE microglial est encore peu connu. Cependant, il a été démontré que l'allèle ApoE-ε4 est fortement associé avec la microgliose, les porteurs de cet allèle présentant plus de microglies réactives [Minett et al., 2016; Belinson and Michaelson, 2009; Rodriguez et al., 2014]. De plus, ApoE est sur-exprimée dans les DAMs [Keren-Shaul et al., 2017] et module la transcription de facteurs homéostatiques et inflammatoires [Krasemann et al., 2017]. Cet effet sur la neuroinflammation semble dépendant de l'allèle. En effet, des souris exprimant ApoE-ε4 sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires que les souris ApoE-ε3 [Guo et al., 2004; Vitek et al., 2009; Zhu et al., 2012]. Cependant, l'effet pro-inflammatoire d'ApoE semble dépendant du contexte puisqu'en présence d'Aβ, ApoE induit une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires [Guo et al., 2004].

L'ensemble de ces données permettent d'apprécier le lien complexe entre ApoE, l'amyloïde-β et la microglie. ApoE est indubitablement impliqué dans la MA du fait de ses effets sur l'Aβ mais aussi par sa capacité à moduler la réaction neuroinflammatoire. Des études sont cependant requises pour mieux comprendre l'interaction entre ces trois facteurs.

Trem2, le facteur de risque émergent

À part ApoE, un autre facteur de risque génétique de la MA très étudié est TREM2. En effet, les études GWAS ont identifié divers variants de TREM2 associés à la MA [Guerreiro et al., 2013; Jin et al., 2014]. Le variant *rs75932628* est le plus fortement associé avec la pathologie et cause une mutation perte de fonction, ce qui suggère que TREM2 joue un rôle protecteur dans la pathologie [Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013].

TREM2 est un récepteur exprimé à la surface membranaire des cellules myéloïdes dont les microglies [Kiialainen et al., 2005; Schmid et al., 2002]. Notamment, il est impliqué dans l'inflammation [Piccio et al., 2007], la phagocytose [Takahashi et al., 2005] et la sécrétion de chémokines [Bouchon et al., 2002; Sieber et al., 2013]. L'influence de TREM2 dans la MA est intensément débattue dans la littérature. Cependant, il est démontré que TREM2 module l'inflammation. *In-vivo*, les souris APP/PS1 KO pour TREM2 présentent une réponse pro-inflammatoire diminuée [Jay et al., 2015]. Au contraire, *in-vitro* une déficience en TREM2 induit une augmentation de la réponse pro-inflammatoire [Jiang et al., 2014; Takahashi et al., 2005].

L'implication de TREM2 dans la MA est complexe et encore floue mais semble dépendre de l'âge et du modèle. L'expression de TREM2 est augmentée dans les microglies associées aux plaques [Frank et al., 2008; Guerreiro et al., 2013] et cette augmentation est nécessaire pour l'activation complète des DAMs montrant un rôle crucial de TREM2 dans la réaction microgliale [Keren-Shaul et al., 2017]. Par ailleurs, différentes études démontrent que la déficience en TREM2 est responsable d'une diminution du nombre de microglies associées aux dépôts amyloïdes [Jay et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2018]. La plupart des études sur les fonctions microgliales de TREM2 dans la MA

se sont portées sur la phagocytoses de l'Aβ. Les résultats restent controversés. *In-vitro*, TREM2 facilite la phagocytose de l'Aβ_{1-42} par les microglies [Jiang et al., 2014]. *In-vivo*, alors que chez les APP21 de 3 mois l'haplodéficience en TREM2 ne modifie pas le nombre de plaques [Ulrich et al., 2014], chez les APP/PS1 à 4 mois un KO total de TREM2 induit une réduction du marquage amyloïde [Jay et al., 2015]. TREM2 joue donc des rôles complexes sur la pathologie amyloïde suggérant un effet dépendant de l'âge et du modèle. D'autre part TREM2 interagit avec l'Aβ et module ainsi différentes fonctions microgliales comme leur prolifération, la dégradation d'Aβ ou la réponse inflammatoire [Zhong et al., 2018].

Les nombreux autres facteurs de risques génétiques

Les études pan-génomiques ont permis d'identifier un grand nombre d'autres facteurs de risques génétiques microgliaux [Karch and Goate, 2016; Efthymiou and Goate, 2017]. Certains d'entre eux tels que CD33, CR1 ou ABCA7 ont été impliqués dans les processus de phagocytose de l'Aβ par les microglies. Pour d'autres, comme MS4A6A, les informations fonctionnelles restent inconnues et seule une corrélation entre niveau d'expression du gène et des marqueurs de la pathologie sont connus [Karch et al., 2012]. Certains autres facteurs de risques génétiques microgliaux identifiés grâce aux GWAS doivent encore être confirmés, c'est notamment le cas de CD33 [Bellenguez et al., 2020].

Il existe encore d'autres gènes microgliaux issus des GWAS et potentiellement impliqués dans la MA. Leurs contributions dans l'initiation et/ou la progression de la MA restent pour l'instant toujours peu connues et attendent d'être caractérisées.

C.2 Les microglies au stade précoce de la MA

Dans les stades tardifs de la MA, les microglies impliquées dans la neuroinflammation sécrètent un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires conduisant à une réaction prolongée qui devient délétère pour le parenchyme nerveux (Voir Revue [Heneka et al., 2015]).

Des études récentes montrent cependant que cette réaction microgliale pourrait commencer des décennies avant l'apparition des troubles cognitifs [Cuello, 2017; Hampel et al., 2020], à un stade encore pré-clinique [Hampel et al., 2020; Nordengen et al., 2019], et indépendamment de Tau ou de l'Aβ.

Une théorie plaçant la neuroinflammation comme étiologie de la MA permet de concilier ces deux hypothèses physiopathologiques. Dans ce scénario la neuroinflammation est vue comme un phénomène biphasique et non pas linéaire. Ainsi, un premier pic d'inflammation apparaîtrait de manière précoce. Puis, une seconde inflammation, cette fois-ci en réponse à l'Aβ et P-Tau, constituerait le pic tardif [Cuello, 2017; Fan et al., 2017]. Le maintien de cette inflammation sur le long terme au stade tardif pourrait être délétère et contribuer à la progression de la MA.

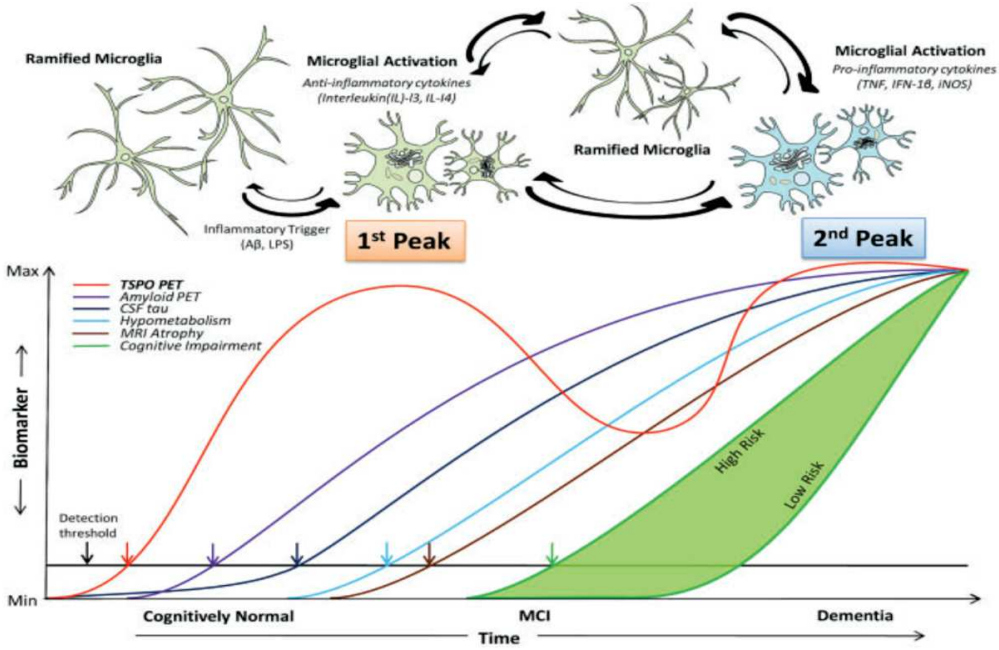


FIGURE 1.12 – **Cinétique d'apparition des caractéristiques de la MA** - La neuroinflammation (en orange) est un processus complexe, possiblement biphasique. Cette hypothèse place la neuroinflammation comme un facteur étiologique de la MA. Se développent ensuite, dans l'ordre : l'amyloidose, la tauopathie et l'hypométabolisme menant à la neurodégénérescence reflétée par l'atrophie corticale. Enfin, les déficits cognitifs se mettent en place. Cet ensemble de facteurs sera responsable du développement de la MA. Tiré de Fan et al.

À l'heure actuelle, les mécanismes responsables du développement de la MA sont encore mal connus. Il parait évident qu'il s'agit d'une pathologie multi-factorielle dans laquelle, l'Aβ, P-Tau et la neuroinflammation s'entremêlent jusqu'à la mort neuronale causant ainsi des perturbations cognitives. Comprendre son initiation représente un point crucial pour le développement de thérapies permettant de ralentir la pathologie.

C.3 Fonctions microgliales impliquées dans le développement de la MA

Les rôles physiopathologiques des microglies dans la MA sont encore à élucider. Actuellement, deux dogmes s'affrontent : l'un suspecte que les microglies deviennent réactives en réponse à l'Aβ et sécrètent des molécules neurotoxiques, et l'autre prône un effet neuroprotecteur via la sécrétion de facteurs neurotrophiques et l'élimination de l'Aβ par phagocytose [Heneka et al., 2015].

C.3.i La microglie répond à l'Aβ

Différentes études ont montré, chez l'Homme et dans les modèles animaux de la MA, que les microglies sont attirées par les dépôts d'Aβ [Simard et al., 2006]. Elles sont capables de reconnaître le peptide grâce à une large variété de récepteurs [Mosher and Wyss-Coray, 2014]. Parmi ceux-ci, les plus étudiés sont les TLRs -2, -4 et -6 [Liu et al.,

2012] ou CD36 [El Khoury et al., 2003].

L'activation de ces récepteurs induit un changement d'état microglial. Notamment, on observe un changement global de morphologie des microglies, que ce soit lorsqu'elles sont associées aux plaques [Bouvier et al., 2016] ou non [Baron et al., 2014]. Lors de cette réaction, les microglies sont à la fois soupçonnées d'être responsable de l'agrégation de l'Aβ mais aussi de sa dégradation [Mildner et al., 2011].

La microglie dégrade l'Aβ

La microglie dégrade l'Aβ de différentes manières selon la conformation de cette dernière. Les fibriles amyloïdes qui sont plus résistants à la dégradation enzymatique, sont phagocytés puis dirigés vers la voie du lysosome pour leur dégradation. Au contraire, les peptides d'Aβ solubles peuvent être dégradés par différentes protéases [Lee and Landreth, 2010]. Dans la microglies, ces peptides peuvent être dégradés par macropinocytose c'est à dire une capture du milieu extracellulaire contenant le peptide [Jiang et al., 2008; Mandrekar et al., 2009]. Les microglies peuvent aussi dégrader ces peptides de manière intracellulaire grâce à MME [Jiang et al., 2008] ou de manière extracellulaire en sécrétant des protéases comme IDE [Qiu et al., 1998; Mosher and Wyss-Coray, 2014]. Ces mécanismes de clairance de l'Aβ solubles sont notamment régulés par ApoE [Jiang et al., 2008]. Jiang et al. démontrent que les activités des enzymes intra- et extracellulaires responsables de la clairance de l'Aβ par les microglies varient suivant l'allèle d'ApoE et son état de lipidation.

Ces résultats montrant la phagocytose de l'Aβ par les microglies sont cependant controversés [Aguzzi et al., 2013; Mosher and Wyss-Coray, 2014]. Deux études dans des modèles animaux, suggèrent que les microglies n'ont aucune influence sur la pathologie amyloïde [Grathwohl et al., 2009; Mildner et al., 2011]. En effet, chez les APP/PS1, une ablation des microglies n'induit aucun changement sur la formation des plaques, la concentration en Aβ ou la neurotoxicité [Grathwohl et al., 2009]. De plus, dans trois modèles animaux différents, Mildner et al., démontrent qu'une perte des microglies n'entraîne pas de modification du nombre de plaques amyloïdes ni de la concentration en Aβ. Selon les auteurs, seuls les phagocytes CCR2+ provenant de la périphérie et infiltrant le SNC sont responsables de la clairance de l'Aβ.

La microglie favorise la formation des plaques

Les microglies sont soupçonnées d'être impliquées dans la formation des plaques amyloïdes denses [Mildner et al., 2011; Akiyama et al., 2000; Griffin et al., 1995]. Les cellules microgliales sont incapables de pénétrer le coeur des plaques denses et sont donc retrouvées à leur périphérie [Heneka et al., 2015]. Les auteurs postulent donc sur leur rôle dans la formation des plaques [Wegiel et al., 2004]. Leur hypothèse est basée sur deux résultats : le nombre de microglies associées avec les plaques est corrélé avec la taille des

dépôts, et une observation ultrastructurelle démontre la présence de fibriles amyloïdes dans la microglie.

L'une des explications pourrait être que dans les phases précoces de la MA les microglies essayent de dégrader l'Aβ sur-produit mais finissent par s'épuiser. Face à la concentration croissante d'Aβ et leur incapacité à le dégrader totalement elles compacteraient les plaques de manière à réduire la biodisponibilité des oligomères toxiques. Ainsi, leur rôle dans la pathologie amyloïde peut avoir été mal interprété à une époque où l'on pensait les dépôts plus toxiques que les oligomères.

C.3.ii Élimination des synapses/neurones Tau positifs

Une co-localisation entre des microglies activées et des oligomères de Tau est observée dans les modèles murins de la MA et dans les cerveaux de patients [Sheffield et al., 2000; Hayes et al., 2002; Nilson et al., 2017]. *In-vitro*, dans des cultures de microglies, la présence de Tau mal conformée suffit à induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β, TNF-α) par ces cellules [Kovac et al., 2011]. Ceci suggère que les agrégats de Tau sont capables d'activer les microglies [Gentleman, 2013; Laurent et al., 2018].

Comme en réponse à l'Aβ, les microglies activées par Tau présentent une plus grande activité phagocytaire. Ainsi, que ce soit chez les modèles murins ou chez l'Homme, les microglies peuvent phagocyter la protéine Tau extracellulaire et les agrégats de Tau hyperphosphorylée [Bolós et al., 2016; Brelstaff et al., 2018; Vogels et al., 2019]. Les microglies phagocytent aussi les synapses contenant des agrégats de Tau, et peuvent même éliminer des neurones entiers [Brelstaff et al., 2018]. Lors du vieillissement, l'état de sénescence microglial est corrélé plus fortement avec la pathologie Tau qu'avec l'activation microgliale proprement dite [Vogels et al., 2019]. La capacité microgliale à réguler la pathologie Tau semble donc dépendante de l'âge et du stade de développement de la pathologie.

Ainsi, pour la pathologie Tau comme pour la pathologie amyloïde, le phénotype dystrophique des microglies âgées les empêche de protéger efficacement le parenchyme et conduit à la perte de leurs fonctions protectrices [Vogels et al., 2019].

C.3.iii La réaction microgliale, positive ou délétère ?

Le rôle de la neuroinflammation induite par la microglie dans la l'initiation et dans progression de la MA est toujours un sujet d'intenses débats [Aguzzi et al., 2013; Gentleman, 2013]. L'hypothèse émergente est que d'un côté, cette inflammation est nécessaire pour faire face à l'état d'urgence pathogénique, mais que d'autre part, si elle est trop soutenue, elle peut vite enclencher une spirale délétère [Cotman et al., 1996].

Lors de leur réaction contre l'Aβ et Tau, les microglies, activent l'inflammasome NLRP3 [Heneka et al., 2013] et sécrètent des facteurs pro-inflammatoires [Vogels et al., 2019], tels que l'IL-1β et le TNF-α.

Les effets précis de ces cytokines sont controversés. Alors qu'une étude démontre que le TNF-α permet d'augmenter la phagocytose d'Aβ par la microglie [Janelsins et al., 2008], *Hickman et al.* démontrent, au contraire, que cette cytokine réduit le nombre de récepteurs phagocytaires de la microglie favorisant ainsi l'agrégation d'Aβ [Hickman et al., 2008].

La neuroinflammation induite par les microglies semble aussi responsable de l'aggravation de la pathologie Tau [Vogels et al., 2019]. Ces mécanismes sont aussi directement médiés par les cytokines pro-inflammatoires microgliales [Gorlovoy et al., 2009] telles que l'IL-1β [Li et al., 2003], l'IL-6 [Quintanilla et al., 2004], l'IL-18 [Ojala et al., 2008] ou encore le TNF-α [Janelsins et al., 2008], qui participent à l'hyperphophorylation et/ou l'agrégation de Tau.

Enfin, la NOX microgliale est responsable de la production de ROS induites par l'Aβ [Mosher and Wyss-Coray, 2014; Della Bianca et al., 1999; Jekabsone et al., 2006; Wilkinson and Landreth, 2006]. Ces ROS participent à l'accumulation de Tau induite par les microglies [Gorlovoy et al., 2009]. De plus, le stress oxydant causé par ces produits contribue à la perte neuronale.

En conclusion, la littérature montre clairement qu'une activation prolongée des microglies peut être délétère en contribuant à l'aggravation des pathologies amyloïdes et Tau et peut aussi mener à la neurodégénéréscence. Néanmoins, la plupart des études ont été réalisées à des stades avancés de la pathologie. De manière intéressante, des études récentes notamment chez l'Homme, indiquent qu'une activation microgliale précoce est associée à un meilleur pronostique clinique [Fan et al., 2017]. Il est donc encore nécessaire d'étudier ces voies inflammatoires, et en particulier la réaction microgliale, pour comprendre plus précisément leurs rôles dans le développement de la MA. Un facteur crucial souvent négligé lors de ces études est le stade de la pathologie. Il est fort probable que cette neuroinflammation ne soit pas linéaire et que sa dynamique soit complexe. C'est l'analyse de cette dynamique neuroinflammatoire qui permettra de conclure sur ses effets bénéfiques (précoces ?) et délétères (tardifs ?). En modulant les acteurs de cette inflammation, au bon moment, nous avons l'espoir de pouvoir moduler le développement de cette pathologie.

C.4 L'hétérogénéité microgliale dans la MA

Si différents types de microglies co-existent dans un encéphale sain, on peut se poser la question de savoir si, dans un contexte pathologique, les microglies convergent vers phénotype réactif unique ou si, au contraire, la pathologie constitue une facteur supplémentaire d'hétérogénéité.

Dans la MA, les microglies détectent divers stimuli : Aβ, P-Tau, souffrance neuronale, et suivant leur distance de ces signaux pathologiques, elles n'auront pas la même réponse. La capacité des microglies à réagir à leur environnement les rend propice à se scinder en sous-populations dont l'existence peut être révélée par différentes approches.

C.4.i Hétérogénéité morphologique

Selon leur distance par rapport aux plaques amyloïdes, les microglies présentent des morphologies différentes. Dans des tissus de patients atteints de la MA, les microglies qui entourent les plaques amyloïdes présentent une morphologie dystrophique démontrant leur réponse à cette lésion histologique [Plescher et al., 2018; El Hajj et al., 2019]. Ces microglies ont un corps cellulaire plutôt rond avec des très petits prolongements ; elles peuvent même présenter une forme améboïde (Figure 1.13). Ces changements morphologiques liés à leur réaction, s'accompagnent de changements fonctionnels [Bouvier et al., 2016; Plescher et al., 2018; El Hajj et al., 2019]. Alors que les changements liés à leur activité phagocytaire restent controversés [Wendt et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017], les microglies autour des plaques présentent une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires.

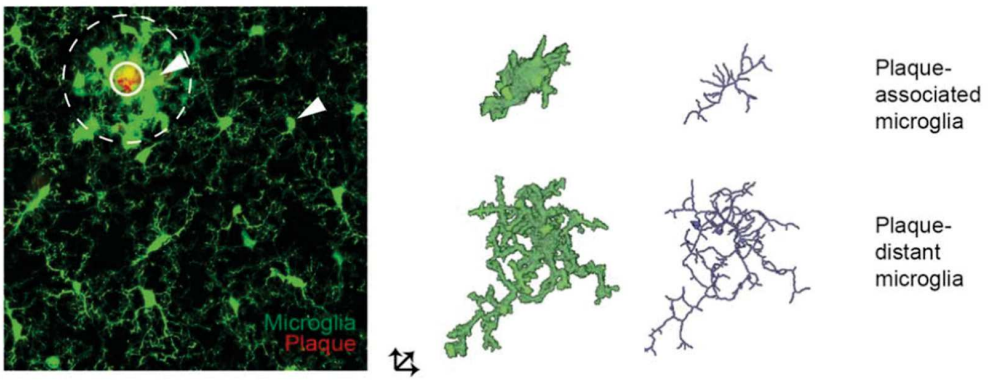


FIGURE 1.13 – **Morphologie des microglies associées aux plaques et des microglies distantes des plaques dans le modèle TgCRND8 de la MA** - Immunofluorescence de plaque amyloïde (Thiazine Red, Rouge) et microglies ($CX_3CR_1^{+/eGFP}$, Vert). Le cercle plein délimite le coeur de la plaque et le cercle en pointillé les microglies associées à la plaque. Reconstruction tridimensionnelle des microglies (Vert) et du squelette cellulaire (Bleu) de microglies associées à la plaque (haut) ou distantes de la plaque (bas). Les cellules présentées sont pointées par les têtes de flèches. Tiré de [Plescher et al., 2018]

À l'inverse, les microglies dans le parenchyme, éloignées des plaques, présentent une morphologie homéostatique (Figure 1.13). Les fonctions de ces microglies se situant dans un contexte pathogénique mais non associées directement à des lésions sont peu étudiées.

C.4.ii Hétérogénéité transcriptomique

L'analyse du profil transcriptomique des microglies a permis de révéler de nombreux changements dans l'expression génique dans des modèles murins de la MA [Orre et al.,

2014; Wang et al., 2015]. Cependant ces analyses mesuraient les expressions géniques de cellules microgliales isolées par FACS, correspondant donc à une population globale de microglies. Ces résultats ne reflètaient donc pas la réponse cellulaire à l'échelle de la cellule unique et ne permettaient donc pas d'apprécier son hétérogénéité. C'est en 2017, avec l'avènement des techniques de séquençage en cellule unique (scRNA-seq), que les publications phares ont permis de révéler la diversité microgliale dans la MA [Hashemiaghdam and Mroczek, 2020].

Bien que n'utilisant pas une approche de scRNA-seq, Krasemann et al. ont étudié l'hétérogénéité microgliale en comparant différentes conditions physiopathologiques : vieillissement, MA, SLA et SEP. Par des approches de clusterisation, ils ont ainsi pu distinguer deux clusters principaux qu'ils ont associés à deux sous-types de microglies : les microglies M0 et les microglies de type neurodégénératif (MGnD). Chez les microglies M0, ils observent l'expression de 68 marqueurs homéostatiques dont *P2ry12*, *Tmem119*, *Csf1r*, *Cx3Cr1* et *Tgfb1*. À l'opposé, dans les microglies MGnD, ils mesurent une augmentation de l'expression de 28 gènes inflammatoires dont *Clec7a*, *Ccl2*, *Csf1* et *Apoe*. Leurs résultats ont ainsi permis de mettre en évidence une hétérogénéité moléculaire des microglies associées aux pathologies neurodégénératives. Ils ont en outre montré que la transition entre l'état M0 qui représente l'état homéostatique, et l'état MGnD s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'*Apoe* et d'une réduction des voies de signalisation du TGF-β. En utilisant des souris KO pour les protéines TREM2 et ApoE, ces auteurs démontrent aussi l'importance de cette voie de signalisation pour la transition d'un phénotype homéostatique vers un phénotype neurodégénératif, et révèlent le rôle crucial de l'ApoE microglial.

Chez des souris APP/PS1 à 9 et 24 mois, des âges où l'amyloïde est déjà présent, l'étude de la localisation des marqueurs P2Y12 et CLEC7A leur permet d'identifier trois sous-populations : une population CLEC7a^{-}/P2Y12^{+} non associée aux plaques, une population CLEC7A^{low}/P2Y12^{low} proche des plaques et une population CLEC7A^{+}/P2Y12^{-} associée aux plaques.

Ainsi, ces auteurs ont pu démontrer, tant du point de vue transcriptomique ou du point de vue protéique, l'existence d'une hétérogénéité moléculaire au sein de la population microgliale dans le contexte de la MA.

Au même moment, Keren-Shaul et al. sont les premiers à mettre en évidence une hétérogénéité microgliale complexe dans la MA . Chez les 5xFAD, ils identifient trois sous-populations microgliales distinctes. Les microglies homéostatiques exprimant les facteurs classiques tels que *P2ry12*, *Tmem119*, *Csf1r*, *Cx3Cr1* et *Hexb* qui peuvent, dans le contexte de la MA, transiter vers un autre état : les microglies associées à la pathologie (ou DAM). Parmi ces DAMs, ils identifient deux sous-populations dont la proportion relative augmente avec le décours de la pathologie. D'une part les DAM1, dont l'émergence ne dépend pas de l'expression de *Trem2*, et dans lesquelles le niveau d'expression de gènes homéostatiques diminue et celui des gènes inflammatoires comme

Ctsd, *Tyrobp* et *ApoE* augmente. D'autre part les DAM2, qui apparaissent plus tardives, et dont l'émergence dépend de *Trem2*. De manière intéressante, les DAM2 expriment une partie des facteurs de risques génétiques de la MA, tels que *Trem2* mais aussi des gènes inflammatoires comme *Cst7*, *Clec7a*, ou *Csf1*. En réalisant des marquages histologiques de certains marqueurs des DAM2, ces auteurs associent aussi les DAM2 aux dépôts amyloïdes. Constatant que les agrégats Aβ sont plus nombreux dans les microglies DAM2, ils suggèrent que ces dernières présentent une activité phagocytaire augmentée. Ils en déduisent que les DAMs jouent des rôles bénéfiques dans la MA. De manière intéressante, ils définissent les stades homéostatiques, DAM1 et DAM2, comme un continuum. En effet, ils ne retrouvent pas de DAM2 sans la présence de DAM1, les amenant à conclure que les microglies homéostatiques doivent d'abord passer par un stade DAM1 précoce avant d'atteindre le stade DAM2 tardif.

Le modèle CK-p25 est un modèle de neurodégénérescence associé à une amyloïdose et des DNFs, mimant les aspects tardifs de la MA. Dans ce modèle, Mathys et al. démontrent l'existence de différents états microgliaux qui dépendent du stade de la neurodégénérescence . En examinant la réponse microgliale au cours du développement de la pathologie, ils identifient 3 sous-populations principales : les microglies homéostatiques, les microglies du stade précoce ou (ERM) et les microglies du stade tardif ou (LRM). Les ERMs sont caractérisées par une augmentation de l'expression de gènes associés à la prolifération (cycle cellulaire, réplication de l'ADN, etc.) et certaines cytokines telles que *Mif* ou *Tnfa*. Les LRMs, quant à elles, se distinguent par une augmentation de l'expression de gènes de la réponse immunitaire (réponse innée, réponse aux virus, MHC-II, voie de l'interféron, etc.). Ces deux sous-populations bien distinctes semblent former un continuum de stades de réaction microgliale. En effet, un ensemble de gènes dérégulés dès les stades précoces restent dérégulés au stade tardif. Ainsi, les auteurs suggèrent que les ERMs représenteraient un stade transitoire de reprogrammation des microglies homéostatiques et intermédiaire par rapport aux microglies LRM. Les auteurs suggèrent aussi que les microglies ERMs seraient impliquées dans l'initiation d'une cascade d'évènements qui, en fin de compte, aggrave la neurodégénérescence.

Plus récemment, Sala Frigerio et al. ont utilisé le modèle KI APP^{NL-G-F} pour étudier la diversité microgliale durant le développement de la MA. Grâce à une nouvelle technique de scRNA-seq permettant d'analyser un plus grand nombre de cellules, ils ont identifié 6 sous-populations microgliales. Notamment, ils sont parmi les premiers à montrer une hétérogénéité au sein des microglies homéostatiques. En effet, ils identifient deux sous-populations de microglies homéostatiques, les H1M et H2M, représentant 90% de la population microgliale chez les contrôles, et dont la proportion relative diminue avec la progression de la MA. Par ailleurs, ils identifient un sous groupe minoritaire de microglies prolifératives (CPM), représentant 0.3% à 1.2% de la population totale. Les CPMs sont enrichies en gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, le réarrangement de la chromatine et le cycle cellulaire ; elles sont différentes des microglies homéosta-

tiques mais ne sont pas enrichies dans un génotype particulier.

Ils ont ensuite identifié trois sous-populations de microglies réactives dont la proportion relative augmente avec le stade de la pathologie. Les ARMs (Adaptative Reactive Microglia) sont caractérisées par une augmentation de l'expression de gènes inflammatoires (ex. *Cst7*, *Clec7a* et *Itgax*), des gènes de présentation d'antigène (ex. *Cd74*, *H2-Ab1*, *H2-Aa*, *Ctsb* et *Ctsd*) ainsi que des gènes impliqués dans la régénération. Les TRM (Transiting Reactive Microglia), sont très proches des ARMs mais présentent un niveau expression d'*Apoe* plus faible. Un troisième sous-type important, les IRM (Interferon Reactive Microglia) sont caractérisées par une augmentation de l'expression de gènes liés à la réponse immunitaire et à la voie de l'interféron de type I. Par une analyse en pseudotime [4], les auteurs montrent que les IRMs représentent une population indépendante des ARMs et TRMs. Contrairement aux études précédemment citées et qui présentent les états de réaction microgliale comme un continuum [Krasemann et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017], Sala Frigerio et al. démontrent que la réaction microgliale est encore plus complexe et composée d'états indépendants.

Par l'analyse d'un très grand nombre de cellules, les auteurs montrent que les différentes sous-populations de cellules réactives (ARMs, TRMs, et IRMs) sont présentes chez les contrôles et que leur proportion relative augmente avec l'âge à la fois chez les contrôles et les APP. Ainsi, chacun des sous-types réactifs (ARMs, TRMs, et IRMs) ne sont pas seulement associés à la pathologie mais représentent aussi des états physiologiques de la microglie. En réponse à l'Aβ, les proportions des populations ARMs et IRMs croissent, révélant que la réponse microgliale à l'amyloïde est complexe. Par ailleurs, l'augmentation des populations ARMs et IRMs au cours du vieillissement physiologique soutient l'hypothèse selon laquelle la MA représenterait un vieillissement accéléré.

Une hétérogénéité microgliale dans la MA a aussi été mise en évidence chez l'Homme. *Mathys et al.* mettent en évidence l'existence de différentes sous-populations de microglies dans les cerveaux des patients atteints de la MA [Mathys et al., 2019]. Cependant, ces résultats reposent sur le séquençage d'ARNs présents dans le noyau des cellules (snRNA-seq) et doivent être pris avec précaution. En effet, une étude récente a montré que ce type d'approche n'est pas très adapté à l'étude de la réaction microgliale [Thrupp et al., 2020].

Dans le cadre de la MA, il apparaît intéressant d'essayer de coupler l'analyse de l'hétérogénéité transcriptomique à celle de l'hétérogénéité spatiale, notamment en prenant en compte la localisation par rapport aux plaques amyloïdes. Ces approches dites de spatio-transcriptomiques n'ont été développées que très récemment et jusqu'à présent

4. *L'état physiologique / physiopathologique de toute cellule évolue de manière graduelle. L'analyse du transcriptome en cellule unique est réalisée à un ou des temps donnés, mais puisque les cellules ne seront pas toutes exactement dans le même état, il est possible de les ordonner sur la base de cette transition graduelle et de "reconstituer" la dynamique de l'expression des gènes entre un état A et un état B. Cette reconstitution est représentée en trajectoires dites pseudo-temporelles ou "pseudotime".*

Référence	Modèle	Méthode	Homéostatique	Précoce	Tardif
Krasemann	APP/PS1 SOD1 EAE	Microglies triées RNA-seq	M0	-	MGnD
Keren-Shaul	5xFAD SOD1	scRNA-seq	H	DAM1	DAM2
Mathys	CK-p25	scRNA-seq	H	ERM	LRM
Sala Frigerio	APP NL-G-F	scRNA-seq	H1M, H2M	IRM	ARM

TABLE 1.4 – **Analyse des différents résultats de l'hétérogénéité microgliale au niveau transcriptomique**

n'ont pas permis d'atteindre un résolution cellulaire. En utilisant une telle approche, l'équipe de B. de Strooper a néanmoins analysé le remodelage transcriptomique dans les tissus directement associés aux plaques [Chen et al., 2020]. Ils démontrent que l'ensemble des cellules associées aux plaques amyloïdes présentent un remodelage transcriptomique spécifique et identifient un set de 57 gènes, les PIGs (Plaques Induced Genes), dérégulés à proximité des plaques. Presque un tiers de ces gènes sont communs avec les gènes des DAMs [Keren-Shaul et al., 2017] et ARMs [Sala Frigerio et al., 2019] et de manière intéressante cette population évolue avec le décours de la pathologie et corrèle avec la quantité de dépôts amyloïdes.

La plupart de ces sous-types microgliaux décrits dans les modèles de MA, ne sont pas spécifiques à cette pathologie mais sont retrouvés dans un ensemble des maladies neurodégénératives [Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017]. Ainsi, ces différentes populations microgliales ne sont probablement pas associées à l'étiologie d'une pathologie particulière mais rentrent plutôt dans un programme de clairance et de protection contre des protéines mal conformées et/ou agrégées communes aux maladies neurodégénératives.

Dans l'ensemble, la littérature sur le sujet révèle que la réponse microgliale face aux plaques amyloïdes est multifonctionnelle et complexe. Elle pourrait évoluer selon des branches divergentes associées à des phénotypes moléculaires spécifiques. Une réponse, si complexe dans la MA n'est pas si surprenante dans la mesure où la réaction microgliale est profondément impactée par son micro-environnement. Un travail important à l'avenir sera de disséquer la localisation de ces sous-types microgliaux et de comprendre leur rôle fonctionnel dans le décours de la pathologie. L'existence de différentes sous-populations possédant des fonctions et des rôles différents dans le décours de la pathologie représente ainsi une grande opportunité thérapeutique car elle permet d'envisager de cibler des sous-types particuliers.

D Résultats préliminaires et hypothèses de travail

En conditions physiologiques, les microglies diffèrent en fonction de leur environnement tissulaire [Lawson et al., 1990; Grabert et al., 2016; Fernández-Arjona et al., 2017]. Dans le contexte de la MA, la population microgliale peut être scindée en deux sous-populations de manière évidente : les microglies associées aux plaques amyloïdes et celles qui en sont loin. Comme décrit précédemment (Section C.3.i), cette localisation est corrélée avec une morphologie et des fonctions différentes. Les données de scRNA-seq ont, quant à elles, permis d'établir l'hétérogénéité moléculaire des microglies dans la MA, mais le lien entre diversité morphologique et diversité moléculaire n'est pas si évident à établir car il repose souvent sur quelques marqueurs, pas toujours spécifique des différentes sous-populations.

L'ensemble de ces connaissances ont amené l'équipe à se poser différentes questions :

1. En quoi le transcriptome des microglies associées aux plaques diffère-t-il de celui des microglies éloignées des plaques et de celui des microglies issues d'un cerveau dépourvu de plaques ? Quelles sont les conséquences fonctionnelles pour ces différents sous-type de microglies ?
2. Comment le transcriptome des différentes sous-populations de microglies évolue t-il avec la progression de la MA ?
3. Existe t-il une réaction microgliale dès les stades précoces de la MA et peut-on isoler de nouvelles cibles microgliales précoces ?

Ce sont les réponses à ces questions qui ont servi de fondation à mon projet de thèse.

D.1 La diversité microgliale est dépendante de sa localisation et du stade de la MA

De notre coté, l'équipe a tiré parti du modèle APP/PS1.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$ et de la technique de microdissection laser, pour étudier spécifiquement le remodelage transcriptionnel dans les différentes sous-populations de microglies. Plus spécifiquement, dans cette étude en préparation pour publication, l'équipe a comparé le transcriptome des microglies issues de souris APP/PS1.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$ et WT.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$ à différents âges (Figure 1.14 A). Ainsi, l'équipe a comparé le transcriptome :

1. des microglies associées aux plaques amyloïdes identifiées par un marquage Thiazine Red ;
2. des microglies présentes dans le parenchyme des souris modèles de la maladie mais distantes de plus de 100 μm de tout marquage Thiazine Red ;
3. des microglies isolées chez les animaux contrôles de mêmes âges.

L'analyse des transcriptomes de ces populations cellulaires a ensuite permis de mettre en évidence un impact majeur de la localisation des microglies dans la réaction

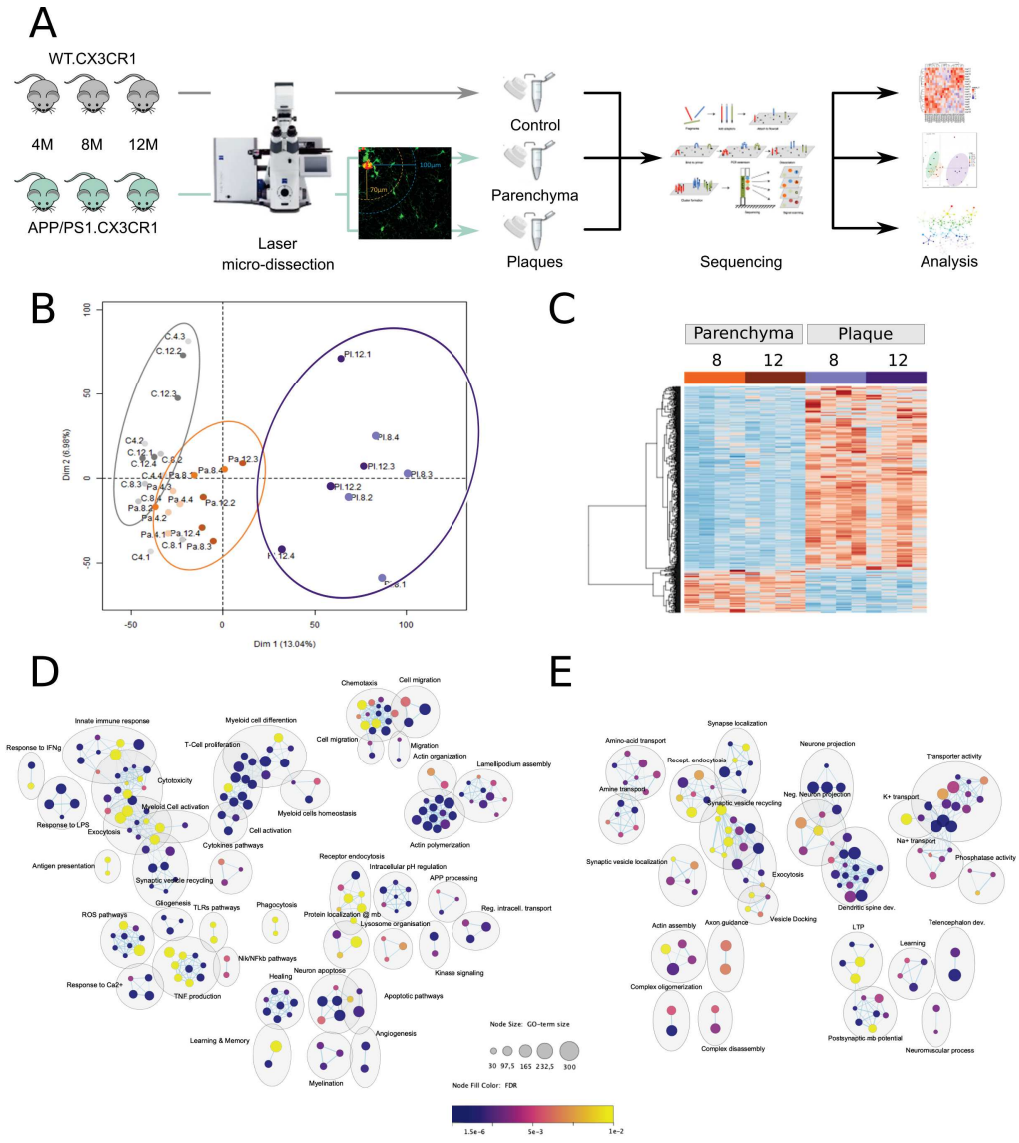


FIGURE 1.14 – **Remodelage du transcriptome des microglies selon leur localisation et la progression de la MA - (A)** Schématisation de la méthodologie utilisée. **(B)** Analyse en composante principale des résultats de l'analyse transcriptomique pour les différents échantillons. Microglies contrôles (gris), microglies du parenchyme APP/PS1 (orange) ou associées aux plaques (violet) à différents âges (plus la couleur est foncée plus l'âge est avancé). **(C)** Heat Map représentant le remodelage transcriptomique entre les microglies du parenchyme APP/PS1 et les microglies associées aux plaques amyloïdes. **(D-E)** Représentation des fonctions (GO-terms) dérégulées entre les microglies contrôles et les microglies associées aux plaques pour deux sets de gènes présentant des profils d'expression différents, Module 1 **(D)** et Module 2 **(E)**.

microgliale. En effet, l'analyse en composante principale sépare les populations microgliales en fonction de leur localisation par rapport aux plaques plutôt qu'en fonction de l'âge des animaux (Figure 1.14 B). Comme suggéré par les études précédentes, quelque soit l'âge, les microglies associées aux plaques sont clairement différentes des deux autres sous-populations [Sala Frigerio et al., 2019; Keren-Shaul et al., 2017; Rothman et al., 2018] [Chen et al., 2020]. En les comparant aux microglies contrôles, l'équipe a identifié plus de 1 800 gènes dérégulés dans les microglies lorsqu'elles sont associées aux plaques (Figure 1.14 C). Ces gènes peuvent être regroupés en deux modules distincts en fonction de leurs profils d'expression. Les gènes du Module-1 (1639 gènes) sont plus fortement exprimés dans les microglies associées aux plaques et relèvent principalement de processus biologiques liés à l'inflammation (Figure 1.14 D). Au contraire les gènes du Module-2 sont globalement moins exprimés dans les microglies associées aux plaques et sont impliqués dans des processus biologiques relatifs à la transmission synaptique.

De manière originale, l'équipe a aussi étudié en détail les microglies non-associées aux plaques, au cours du développement de la MA. L'équipe a donc pu mettre en évidence que dans le parenchyme, indépendamment des plaques amyloïdes, les microglies subissent des remodelages transcriptionnels qui évoluent avec la progression de la MA (Figure 1.14 B-C). Dans ce contexte aussi les gènes dérégulés peuvent être séparés en deux modules de co-expression. Le module le plus abondant comprend 91 gènes qui relèvent de fonctions biologiques liées à l'immunité (c.f. Production de cytokines, Réponse immunitaire, Présentation d'antigène, etc.). Le niveau d'expression de ces gènes augmente avec le stade de développement de la pathologie. Le second module ne contient que 7 gènes dont le niveau d'expression est augmenté dans les microglies isolées de cerveaux porteurs de la pathologie mais ne varie pas en fonction du stade de progression. Ces gènes sont associés à la formation et à la dégradation du peptide Aβ.

Enfin en comparant, chez les animaux modèles de la MA, les microglies associées aux plaques aux microglies qui ne le sont pas, l'équipe a pu montrer que bien que ces deux sous-types partagent des voies de signalisation communes, ils sont également engagés dans des fonctions biologiques spécifiques. De manière intéressante, ces données révèlent également qu'en fonction du stade de développement de la pathologie, certains gènes présentent des dérégulations opposées dans les deux sous-types de microglies.

D.2 Validation des cibles microgliales au stade tardif

Validation spatio-transcriptomique

Les résultats de l'analyse transcriptomique chez les souris APP/PS1.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$ (Publication en préparation), nous ont permis d'isoler certains gènes d'intérêt. Dans un premier temps, j'ai vérifié ces résultats avec la technique du RNAScope. Cette approche permet, en effet, de visualiser l'ARN messager par hybridation *in-situ* sur des coupes de cerveau. Combinée avec un marquage des microglies et un marquage Thiazine Red, elle permet de (i) conserver l'information spatiale, (ii) déterminer si les cibles sont bien exprimées dans les microglies et (iii) préciser dans quel sous-type (microglies associées

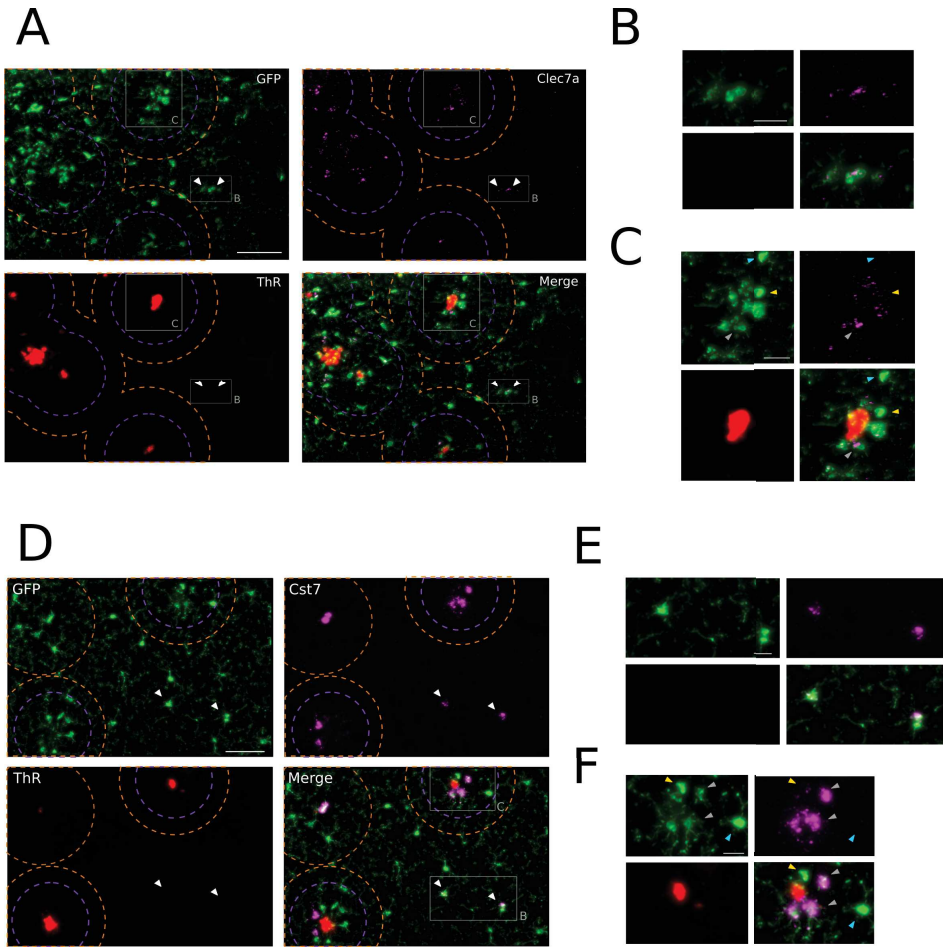


FIGURE 1.15 – **Sur-expression microgliale de *Clec7a* et *Cst7* à 8 mois** - RNA-Scope sur coupes de cortex montrant des microglies (GFP, vert) positives pour *Clec7a* ou *Cst7* (pourpre) et des plaques amyloïdes (Thiazine-Red, rouge) **(A-D)**. Les cercles violets définissent la région autour de la plaque ; les cercles orange sont situés à 100 μm du centre de la plaque et permettent de délimiter les régions dépourvues de plaques. Les microglies positives pour les cibles peuvent être associées **(C-F)** ou non **(B-E)** aux plaques amyloïdes. Les microglies associées aux plaques présentent des niveaux d'expression des cibles différents (évalués en terme de scores). Flèche turquoise, microglie négative ; Flèche jaune, microglie score 1-2 ; Flèche grise, microglie score 4. Barre d'échelle 20 μm.

aux dépôts amyloïdes ou non). Ainsi, au stade intermédiaire de 8 mois, on note une sur-expression des ARNm de *Clec7a* (Figure 1.15 A) et *Cst7* (Figure 1.15 D) dans les microglies. Comme décrit dans la littérature, les cibles sont exprimées dans les microglies associées aux plaques amyloïdes (Figure 1.15 C-F). Cependant, de manière plus inattendue, mes résultats montrent qu'il existe une hétérogénéité de la réponse microgliale autour des plaques. En effet, le niveau d'expression des cibles varie d'une microglie à l'autre (Figure 1.14 C-F, flèches de couleur).

De manière intéressante et en accord avec nos résultats de transcriptomique, ces cibles sont aussi sur-exprimées dans les microglies non-associées aux plaques amyloïdes (Figure 1.15 B-E).

Validation protéique

J'ai ensuite cherché à valider cette expression au niveau protéique. Pour la Cystatine-F, j'ai testé de nombreux anticorps mais je n'ai pas pu obtenir de marquage spécifique. Je n'ai donc pas pu poursuivre l'étude de cette cible au niveau protéique et je me suis donc concentrée sur Dectin-1, le produit de *Clec7a*.

Conformément aux données de littérature [Krasemann et al., 2017], au stade tardif de 12 mois, j'ai pu mettre en évidence, chez les APP/PS1, une sur-expression de Dectin-1 dans les microglies associées aux plaques (Figure 1.16).

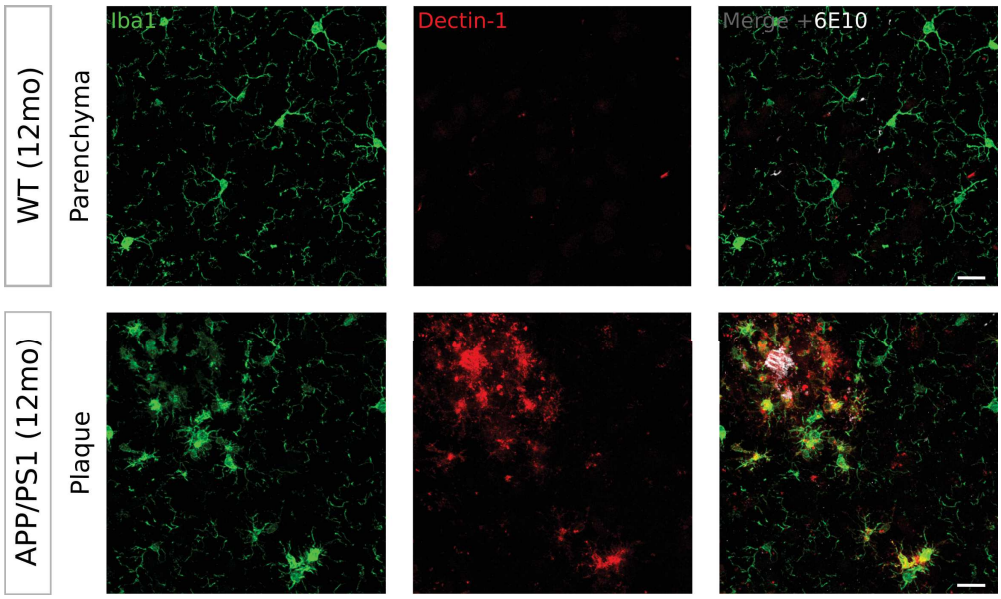


FIGURE 1.16 – **Sur-expression microgliale de Dectin-1 à 12 mois** - Immunofluorescence de régions corticales montrant les microglies (Iba1, vert), Dectin-1 (rouge) et l'amyloïde (6E10, blanc). Barre d'échelle 20 μm.

D.3 Au stade prodromal, le transcriptome des microglies est déjà dérégulé

Dans cette même étude, l'équipe a analysé le transcriptome des microglies au stade précoce. Chez les APP/PS1 de 4 mois, il n'y a que très peu de plaques amyloïdes (voir Publication 2 - Annexe B, [Hemonnot-Girard et al., 2021] et Résultats 1.6). Pour cette raison, l'équipe a donc seulement comparé le transcriptome des microglies du parenchyme isolées chez des souris APP/PS1 et WT à un stade précoce de 4 mois. L'analyse du répertoire de gènes exprimés dans chacune de ces populations nous a permis de démontrer que, dès ce stade prodromal, les microglies subissent des changements transcriptomiques suffisamment importants pour séparer les populations par clustering hiérarchique (Figure 1.17 A). En prenant seulement en considération les microglies isolées à 4 et 8 mois, l'équipe a identifié 36 gènes dérégulés dans le parenchyme (Figure 1.17 B). L'analyse GO indique qu'ils sont impliqués dans la régulation de l'activation des cellules, et en particulier des leukocytes. Comme Mathys et al. dans le modèle CK-p25 de neurodégénérescence, l'équipe a donc démontré une réponse microgliale précoce.

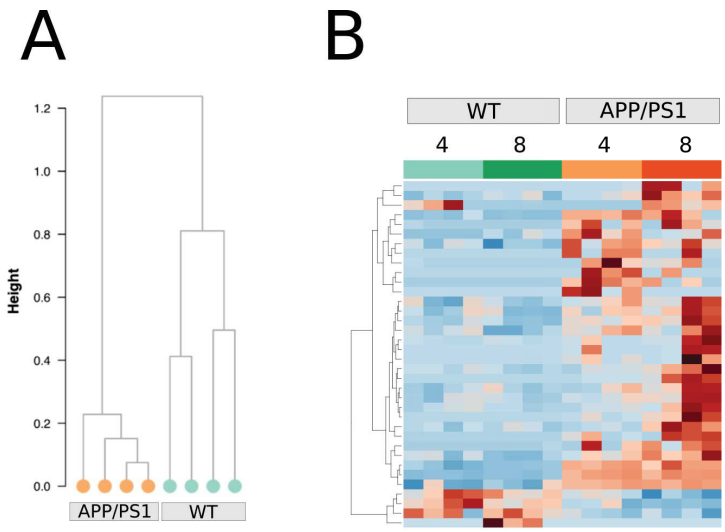


FIGURE 1.17 – **Remodelage transcriptomique des microglies dans le parenchyme aux stades précoces et intermédiaires - (A)** Clustering hierarchique des données d'expression des gènes dans les microglies WT (vert) et APP/PS1 (orange) du parenchyme à 4 mois. **(B)** Heat map des gènes différentiellement exprimés dans les microglies du parenchyme (WT versus APP/PS1) à 4 et 8 mois.

Parmi ces gènes dérégulés, nous nous sommes intéressées à ceux dont le niveau d'expression était non-négligeable et fortement augmenté dans les microglies APP/PS1. Nous avons considéré que ces gènes représentaient de nouvelles cibles microgliales précoces dans la MA. Nous avons porté un intérêt particulier à deux de ces gènes cibles :

Cst7, qui code pour la Cystatine-F et *Clec7a*, qui code pour le récepteur Dectin-1.

E Cystatine-F et Dectin-1, deux cibles d'intérêt

Dans cette partie, et avant de présenter les résultats de ma thèse, je vous présenterai un bilan des connaissances actuelles, que ce soit à la périphérie ou dans le SNC, pour chacun des deux gènes/protéines que nous avons choisis.

E.1 La Cystatine-F

La Cystatine-F, aussi appelée Leukocystatine [Halfon et al., 1998] ou CMAP (Cystatin-like Metastasis Associated Protein) [Morita et al., 2000], est une glycoprotéine [Ni et al., 1998] de 18 kDa appartenant à la famille des cystatines de type II (Figure 1.18 A). Parmi les cystatines du groupe II, les plus étudiées sont les cystatines -F et -C, cette dernière étant la cystatine la plus abondante chez l'Homme [Magister and Kos, 2013]. À la périphérie, la Cystatine-F est une protéine impliquée majoritairement dans la régulation de l'inflammation en modulant les cathepsines. Elle participe aussi dans la communication inter-cellulaire.

E.1.i Caractéristiques générales

Structure

Bien qu'exprimée dans de nombreuses espèces, la Cystatine-F est très peu conservée [Halfon et al., 1998]. Elle est synthétisée sous forme de pro-Cystatine-F de 145 acides aminés et est co-sécrétée avec un peptide signal d'environ 19aa. Sa structure tridimensionnelle a été résolue en 2006 (Figure 1.18 B) [Schüttelkopf et al., 2006] et permet de mettre en évidence le site de liaison avec ses substrats (Figure 1.18 C).

Expression à la périphérie, une Cystatine immunitaire

L'expression de la Cystatine-F est limitée aux cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, lymphocytes natural killers (NK), les cellules dendritiques et les monocytes. [Halfon et al., 1998; Ni et al., 1998; Magister et al., 2012; Prunk et al., 2019]. Dans ces cellules, son expression semble dépendre de la maturité de la cellule immunitaire [Dautović et al., 2018]. Notamment, elle est diminuée par le facteur C/EBPα, un marqueur complexe de la différenciation cellulaire. Par ailleurs, son expression peut être augmentée en réponse à divers stimuli tels que les ligands des TLR3 (ex. Poly i :C) et TLR4 (ex. LPS) [Hamilton et al., 2008] ou encore l'IL-2 [Perišić Nanut et al., 2017; Magister et al., 2015].

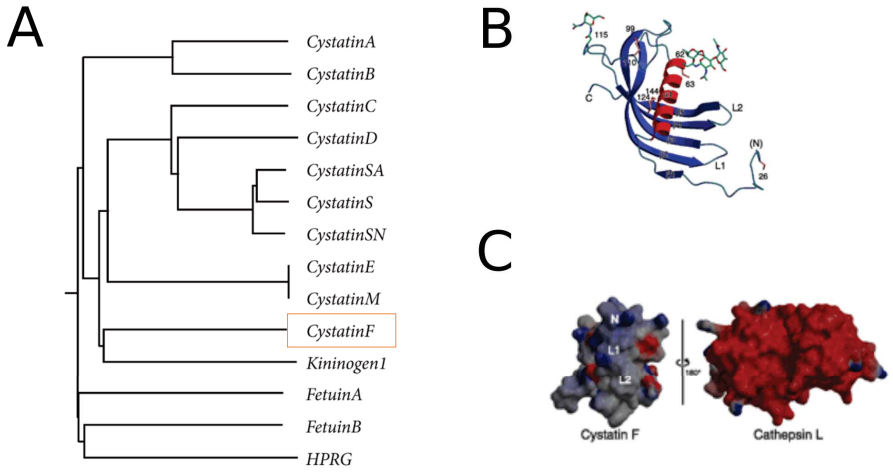


FIGURE 1.18 – **Cystatine-F, famille et structure** - Adapté de [Schüttelkopf et al., 2006; Ochieng and Chaudhuri, 2010]. **(A)** La famille des Cystatines. **(B)** Structure tridimensionnelle de la Cystatine-F et **(C)** Zones d'interactions entre la Cystatine-F et un de ces substrats, la Cathepsine-L.

Cystatine-F, une protéine centrale pour réguler les Cathepsines et l'excitotoxicité

La Cystatine-F est produite et sécrétée sous forme d'homodimères inactifs [Prunk et al., 2019] stabilisés par des ponts disulfures [Cappello et al., 2004]. Comme les autres cystatines, elle peut être sécrétée. Cependant, contrairement aux autres cystatines de type II, la Cystatine-F est aussi abondamment retrouvée dans le compartiment intracellulaire (25% de son expression) ce qui suggère qu'elle pourrait y jouer un rôle important [Nathanson et al., 2002]. Son internalisation est dépendante des carbohydrates [Colbert et al., 2009] et permet de moduler l'activité de diverses enzymes dans la cellule cible. Pour jouer son rôle dans la cellule cible, la Cystatine-F doit être clivée sous forme monomérique [Colbert et al., 2011]. Ce clivage est réalisé en N terminal sous l'action d'une protéase [Hamilton et al., 2008], probablement la Cathepsine-V [Maher et al., 2014]. Il libère une forme monomérique active [Langerholc et al., 2005] qui joue des rôles divers dans les cellules immunitaires (Voir Figure 1.19).

Dans un premier temps, l'internalisation puis la glycosylation de la Cystatine-F permettent de la diriger vers les endosomes/lysosomes [Magister et al., 2012; Dautović et al., 2018; Colbert et al., 2009; Langerholc et al., 2005; Perišić Nanut et al., 2017]. Dans ces compartiments, la Cystatine-F se lie et inhibe l'activité d'un grand nombre de Cathepsines, dont la Cathepsine-L [Magister et al., 2012; Langerholc et al., 2005]. Cette dernière est nécessaire au chargement du MHC-II et du Legumain impliqués dans les fonctions des CPA [Alvarez-Fernandez et al., 1999]. La Cystatine-F, en modulant l'activité de la Cathepsine-L est ainsi impliquée dans les mécanismes de présentation des antigènes. Par ailleurs, la Cystatine-F exogène inhibe l'activité lysosomale en inhibant le Legumain, la convertase de la Cathepsine-L, et en stabilisant la Cathepsine-L

sous forme inactive [Colbert et al., 2011]. Cette inhibition lysosomale pourrait jouer un rôle, d'une part, dans la dégradation des pathogènes phagocytés ou de protéines mal-conformées, et d'autre part, dans l'activité cytotoxique des cellules immunitaires.

Les cellules NK utilisent différents mécanismes pour éliminer les cellules cibles. L'une de ces voies, la cytotoxicité médiée par des granules, implique deux mécanismes : d'une part, la voie de la perforine, une protéine capable d'induire la formation de pores dans la membrane de la cellules cibles ; et d'autre part, la voie des granzymes A et B, induisant l'apoptose [Perišić Nanut et al., 2017]. La Cystatine-F monomérique, une fois glycosylée [Perišić Nanut et al., 2017], inhibe cette cytotoxicité des NK : elle ne modifie pas l'exocytose des granules cytotoxiques [Perišić Nanut et al., 2017; Kos et al., 2018] mais inhibe la Cathepsine-C [Magister et al., 2015] causant l'inhibition des granzymes A et B [Magister et al., 2015; Prunk et al., 2019]. Par ailleurs, en inhibant le Legumain et la Cathepsine-L, la Cystatine-F interfère avec la maturation de la perforine permettant la pénétration des granzymes dans la cellule cible. Enfin, La Cystatine-F régule la *split anergy* [Magister et al., 2015], un statut dans lequel les NK perdent leur activité cytotoxique mais augmentent leur capacité à exprimer et à secréter différentes cytokines [Jewett and Tseng, 2011].

Ainsi en diminuant l'activité cytotoxique des cellules NK et en favorisant la sécrétion de cytokines, la Cystatine-F semble jouer un rôle important dans la réponse immunitaire.

Outre ses rôles physiologiques de régulateur de l'immunité, la Cystatine-F est aussi impliquée dans diverses **pathologies**. En effet, on observe une augmentation de l'ARNm de *Cst7* dans la Polycythemia Vera, une maladie caractérisée par l'augmentation de la prolifération des cellules myéloïdes. Dans ce contexte, la Cystatine-F serait responsable de la diminution de l'apoptose des cellules myéloïdes et participerait donc à l'initiation de la pathologie [Pellagatti et al., 2003]. L'augmentation de l'expression de la Cystatine-F est aussi corrélée avec l'apparition de pathologies pulmonaires [Werle et al., 2003] et de cancers [Perišić Nanut et al., 2017; Georgieva et al., 2008; Utsunomiya et al., 2002]. Dans ces derniers, cette augmentation représente un biomarqueur efficace du pronostic des patients [Georgieva et al., 2008; Utsunomiya et al., 2002]. Dans ce contexte du cancer, la Cystatine-F permettrait aux cellules tumorales d'échapper à la réponse immunitaire [Perišić Nanut et al., 2017]. Au contraire, la diminution de *Cst7* dans les cellules mononucléaires sanguines représente un biomarqueur du syndrome de fatigue chronique [Steinau et al., 2004].

Ces diverses implications pathologiques indiquent que la concentration en Cystatine-F doit être finement régulée afin de maintenir un bon équilibre entre ses différents effets.

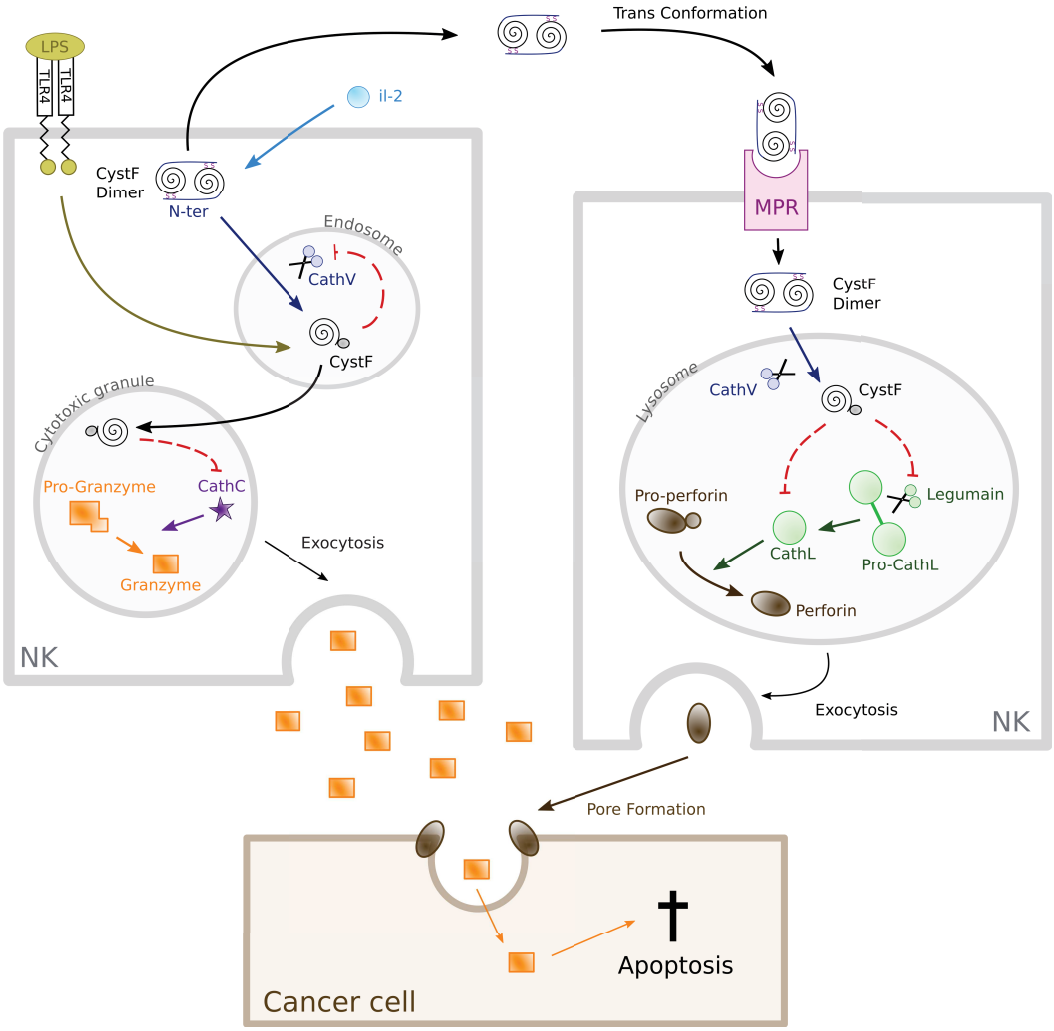


FIGURE 1.19 – **Fonctions de la Cystatine-F à la périphérie** - NK, Natural Killer cell ; MPR, Mannose-6-Phosphate Receptor ; CystF, Cystatine-F ; CathC, Cathepsine-C ; CathV, Cathepsine-V ; CathL, Cathepsine-L ; LPS, Lipopolysaccharide ; TLR, Toll like receptor.

E.1.ii Cystatine-F dans les microglies, expression et fonctions

La Cystatine-F microgliale reflète son état d'activation

En condition physiologique, l'expression de Cystatine-F dans le cerveau est très faible [Halfon et al., 1998; Duan et al., 2012]. Plus particulièrement, virtuellement aucune expression de l'ARNm ou de la protéine n'est détectée dans les microglies homéostatiques [Ma et al., 2011; Duan et al., 2012]. Cependant, son niveau d'expression semble dépendre de l'état d'activation microgliale. En effet, les microglies réactives, notamment dans la matière blanche [Ma et al., 2011; Duan et al., 2012] et la moelle épinière [Durose et al., 2019], expriment fortement la Cystatine-F. D'autre part, l'expression de la protéine peut être diminuée par l'adénosine en activant son récepteur A2AR [Duan et al., 2012, 2018].

Un régulateur de la neuroinflammation et de la démyélinisation

Dans les microglies et la lignée microgliale BV-2, la Cystatine-F régule la neuroinflammation. En particulier, dans des BV-2 dont l'expression de la Cystatine-F a été diminuée (Cystatine-F KD), on observe une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, IL-6 et le TNFα. Ces effets neuroinflammatoires nécessitent l'activation de l'A2AR et passent par les voies des protéines kinases (PKA, PKC, CREB et ERK1/2) [Duan et al., 2018]. Ce rôle neuroinflammatoire semble notamment impliqué dans les processus de démyélinisation et remyélinisation [Ma et al., 2011]. En effet, dans les microglies proches des lésions de démyélinisation, on note une augmentation de Cystatine-F d'autant plus importante que la lésion est sévère [Duan et al., 2012; Durose et al., 2019]. Chez les souris Cystatine-F KO, on observe une aggravation de la démyélinisation. Ce processus serait dû à une augmentation de l'activité de la Cathepsine-C et une augmentation de l'expression de CXCL2, un facteur chemoattractant pour les cellules myéloïdes qui laisse soupçonner un effet néfaste des cellules immunitaires dans la zone lésée [Liang et al., 2016]. Dans ce contexte, la Cystatine-F serait nécessaire et jouerait un rôle protecteur. Par ailleurs, l'expression de Cystatine-F est induite par la phagocytose de myéline compacte *in-vitro* [Ma et al., 2011] et dans des régions de phagocytose active dans le modèle EAE de la sclérose en plaque [Ma et al., 2011; Durose et al., 2019].

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une régulation fine de l'expression microgliale de Cystatine-F est nécessaire. Ainsi, cette protéine jouerait un rôle protecteur dans les pathologies démyélinisantes, d'une part, en limitant la sur-inflammation dans les zones lésées et en permettant la phagocytose de la myéline et donc le "nettoyage" de l'environnement, et d'autre part, en facilitant la régénération.

Enfin, la Cystatine-F représente un biomarqueur du syndrome d'Aicardi–Goutières (SAG). Le SAG est une encéphalopathie rare se développant durant la première année de vie. Cette pathologie est notamment caractérisée par une atrophie cérébrale ainsi que la présence d'IFNα et lymphocytes dans le LCR. Dans cette pathologie, Izzotti et al. ont démontré une augmentation d'un facteur 2.4 du taux de Cystatine-F dans le LCR des patients. Ces auteurs notent aussi une augmentation d'un facteur 10 du niveau en Cathepsine-D qui serait impliquée dans la lésion du tissu nerveux. On peut donc soupçonner que l'augmentation de la Cystatine-F représenterait un mécanisme de protection visant à diminuer l'état inflammatoire et possiblement l'activité de la Cathepsine-D.

E.1.iii Une cible intéressante dans la MA

Une sur-expression de *Cst7*, le gène de la Cystatine-F, a été mis en évidence dans le tissu nerveux dans divers modèles de la MA [Ofengeim et al., 2017; Hüttenrauch et al., 2018; Haure-Mirande et al., 2019; Wang et al., 2020]. Des études centrées sur les microglies, démontrent aussi une augmentation de *Cst7* au cours du développement de la MA dans ces cellules. Dans l'étude de Keren-Shaul et al., l'augmentation de *Cst7*

n'est caractéristique que des DAM2 mais pas des DAM1. Pour aller dans le même sens, *Cst7* est identifié comme un gène important des ARMs [Sala Frigerio et al., 2019]. Ainsi, *Cst7* semble impliqué dans les microglies réactives dans la MA mais jusqu'à présent, l'augmentation de son expression a été mise en évidence plutôt à un stade tardif.

D'un point de vu fonctionnel, la Cystatine-F peut moduler l'activité de diverses Cathepsines. Or, il a été démontré que certaines de ces protéases, telles les Cathepsines-B, -D et -L sont impliquées dans la MA [Hook et al., 2012; Cermak et al., 2016]. En effet, les Cathepsines jouent un rôle crucial dans les processus de dégradation lysosomale. Plus particulièrement, les Cathepsines -B et -L sont essentielles à la régulation de BACE1 et à la correcte dégradation de l'APP [Cermak et al., 2016]. Ainsi, une élévation en Cystatine-F pourrait être responsable d'une trop forte inhibition de la Cathepsine-L et donc d'un défaut d'inhibition de BACE1 induisant une sur-production du peptide Aβ. La Cathepsine-B a été identifiée comme une β-sécrétase responsable de la production de peptide Aβ. De manière intéressante, l'inhibition de cette Cathepsine permet de réduire la concentration d'Aβ dans des modèles de la MA et s'accompagne d'une amélioration des capacités cognitives [Hook et al., 2012]. Dans ce contexte, l'augmentation de Cystatine-F pourrait donc au contraire présenter des effets bénéfiques.

De manière intéressante, la Cystatine-C, une cousine de la Cystatine-F, est aussi impliquée dans la MA [Ii et al., 1993]. Notamment, elle colocalise avec l'Aβ dans des cas sporadiques d'angiopathie amyloïde et co-immunoprécipite avec l'APP [Ochieng and Chaudhuri, 2010]. Son niveau d'expression est doublé chez les patients atteints de la MA, et cette protéine a récemment été identifiée comme un biomarqueur potentiel de cette dernière [Heywood et al., 2015].

La Cystatine-F peut être utilisée comme biomarqueur pour des pathologies périphériques [Steinau et al., 2004], et il a été suggéré qu'elle pourrait aussi l'être pour la MA [Nuvolone et al., 2017]. En effet, Nuvolone et al. démontrent une augmentation significative de la concentration en Cystatine-F dans le LCR de patients atteints de la MA.

Enfin, le récepteur A2AR dont l'expression est augmentée dans le cerveau de patients MA [Albasanz et al., 2008] et dans des modèles animaux de la MA [Arendash et al., 2006; Espinosa et al., 2013], est impliqué dans les défauts synaptiques précoces de la MA [Viana da Silva et al., 2016]. De manière intéressante, ce récepteur est capable d'inhiber la Cystatine-F. En effet, une étude récente démontre que l'élévation en Cystatine-F en réponse à une altération des A2ARs est impliquée dans l'apparition des troubles cognitifs chez la souris [Ran et al., 2020]. Ainsi, un défaut de ce récepteur pourrait conduire à une sur-production de Cystatine-F et contribuer au développement de la pathologie. Ces résultats sur l'implication des A2AR d'une part, dans les phases précoces de la MA et d'autre part, dans la régulation de l'expression de Cystatine-F renforce l'intérêt d'étudier cette protéine dans les phases précoces de la MA.

En conclusion, une dérégulation en Cystatine-F se mettant en place au début de la MA pourrait induire des perturbations fonctionnelles dans les microglies. Entre autre, cette sur-production de Cystatine-F pourrait induire une hyper-inhibition des Cathep-

sines, et par voie de conséquence altérer la dégradation de l'Aβ. On peut donc penser qu'une hausse en Cystatine-F serait responsable d'un défaut de phagocytose ou dégradation de l'Aβ initiant par la suite son agrégation. Néanmoins, comme décrit plus haut, l'inhibition des Cathepsines, en particulier de la Cathepsine-B, pourrait avoir des effets bénéfiques. Étudier l'impact de la Cystatine-F dans le développement de la MA et les fonctions microgliales représente une partie de ma thèse qui sera décrite dans la partie résultats.

E.2 Le récepteur Dectin-1

Les résultats de l'analyse transcriptomique (Publication en préparation), nous ont permis d'identifier une autre cible intéressante : le gène de *Clec7a* qui code pour la protéine Dectin-1.

Dectin-1 est un récepteur de 28 kDA appartenant à la famille des récepteurs aux Lectines de type C (CLR). Il agit comme un PRR (Pattern Recognition Receptor, appartenant aux DAMPs) phagocytaire différent de la famille des TLRs. Bien qu'exprimé dans de nombreuses espèces, la séquence de Dectin-1 est très peu conservée [Brown et al., 2007].

E.2.i Structure

Le récepteur Dectin-1, dont la structure a été résolue en 2007 [Brown et al., 2007] (Figure 1.20 B), est composé d'un domaine N-terminal extra-cellulaire, d'un domaine transmembranaire ainsi qu'une queue intra-cellulaire comprenant un domaine ITAM pouvant être phosphorylé [Brown, 2006] (Figure 1.20 A).

Contrairement aux autres membres de la famille des CLRs, Dectin-1 ne possède pas de résidus cystéine dans sa région stalk [Ariizumi et al., 2000], rendant sa dimérisation possible [Brown et al., 2007] mais difficile [Zelensky and Gready, 2005].

Dectin-1 peut exister sous deux formes principales : une forme complète ou une forme tronquée dans laquelle la partie extracellulaire est plus courte [Brown, 2006] (Voir Figure 1.20 A). Chez la souris, Dectin-1 peut être retrouvé sous deux isoformes, courte ou longue, tandis qu'il en existe 8 chez l'Homme [Schorey and Lawrence, 2008]. Il existe différents variants des formes humaines courtes de Dectin-1 [Yokota et al., 2001] ; leurs expressions varient selon le type cellulaire [Willment et al., 2005] mais leurs rôles fonctionnels *in-vitro* sont similaires [Willment et al., 2001].

Par ailleurs, Dectin-1 peut être soumis à diverses modifications post-traductionelles telles que la glycosylation [Ariizumi et al., 2000] ou la phosphorylation [Gantner et al., 2003].

E.2.ii Ligands, Adressage et Expression à la périphérie

Bien que, structurellement, Dectin-1 fasse partie de la famille des CLRs, il n'est pas considéré comme un CLR classique car il possède des **ligands** spécifiques.

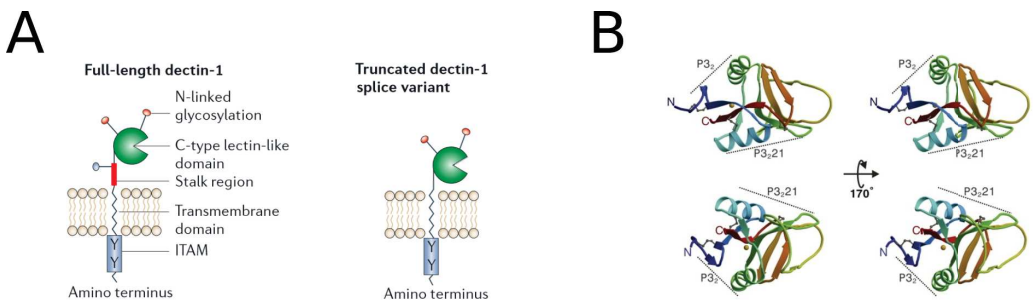


FIGURE 1.20 – **Structure du récepteur Dectin-1 - (A)** Représentation schématique des différents domaines de Dectin-1 sous ses deux formes principales [Brown, 2006]. **(B)** Structure tridimensionnelle d'un monomère de Dectin-1 [Brown et al., 2007].

Ainsi, Dectin-1 a premièrement été défini comme le récepteur aux β-glucanes [Brown et al., 2001]. Les β-glucanes sont des polysaccharides de D-Glucose présents sur la paroi cellulaire des levures et bactéries, mais aussi à la surface de certains champignons. Ces polysaccharides peuvent se retrouver sous différentes formes, de soluble à agrégées (zymosan). L'adressage intracellulaire de Dectin-1 dépend de la nature du β-glucane [Herre et al., 2004]. De manière générale, ce dernier répond peu aux β-glucanes solubles et fortement aux formes agrégées [Goodridge et al., 2011]. Dectin-1 est aussi capable de reconnaître directement les Lymphocytes T CD4+ et CD8+ et d'induire leur prolifération [Ariizumi et al., 2000; Grünebach et al., 2002].

Dectin-1 peut être internalisé lors de la phagocytose d'un pathogène, il sera alors **adressé** soit vers le lysosome, pour induire la dégradation du pathogène ou alors recyclé à la membrane plasmique. Le destin de Dectin-1 internalisé dépend du mécanisme d'internalisation, il peut être phagocyté selon un processus dépendant de l'actine, ou l'endocytosé via les clathrines [Schorey and Lawrence, 2008]. Cette internalisation de Dectin-1 pourrait constituer un signal pour mettre fin à la réponse immunitaire [Hernanz-Falcón et al., 2009].

Dectin-1 est exprimé dès le développement dans divers organes exposés ou nécessaires à la réponse contre des pathogènes (poumons, intestins, thymus, ou la rate) [Reid et al., 2004]. Il est exprimé par une grande variété de cellules, allant de la cellule épithéliale [Li et al., 2013] aux diverses cellules immunitaires. Bien qu'il ait d'abord été défini comme le récepteur spécifique des cellules dendritiques [Ariizumi et al., 2000], son expression dans les macrophages [Brown et al., 2001; Taylor et al., 2002], les monocytes [Taylor et al., 2002], les mastocytes [Kimura et al., 2014], les neutrophiles [Taylor et al., 2002] et les LT [Reid et al., 2004] a ensuite été démontrée. Cette expression cellulaire est variable selon le tissu étudié [Taylor et al., 2002] et dépend de l'état de maturation/différenciation des cellules [Ren et al., 2021].

Dectin-1 est exprimé de manière constitutive dans certaines cellules immunitaires et de nombreuses études indiquent que son niveau d'expression peut être modulé par différents facteurs inflammatoires. Ainsi, l'activation des macrophages par les interleu-

kines -4 et -13 [Taylor et al., 2002] conduit à une augmentation rapide de l'expression de Dectin-1 [Willment et al., 2003]. Par ailleurs, dans des macrophages stimulés par l'IL-10 ou le LPS, l'expression de Dectin-1 est diminuée par un mécanisme plus lent. L'IL-10 étant sécrétée par les macrophages en réponse au zymosan, son effet sur l'expression de Dectin-1 permettrait une boucle de rétrocontrôle négatif [Willment et al., 2003]. La modification de l'expression de Dectin-1 est donc cruciale dans le processus d'interaction entre l'hôte et le *fungus*[5]. Dans l'ensemble, ces mécanismes suggèrent que la présence de ce récepteur influence la capacité du système immunitaire à répondre aux pathogènes *in-vivo* [Willment et al., 2003].

Par ailleurs, de manière intéressante, dans les cellules immunitaires, l'expression de Dectin-1 semble augmenter au cours du vieillissement physiologique [Hazy et al., 2019].

E.2.iii Voies de signalisations

Suite à la liaison de son substrat, Dectin-1 peut activer diverses voies de signalisation intracellulaires : (i) la voie principale dite SYK dépendante, (ii) la voie dépendante des TLRs et (iii) une voie associée aux tétraspanines (Voir Figure 1.21).

Voies SYK dépendantes

Le récepteur Dectin-1, une fois activé, peut être phosphorylé par SYK [Gantner et al., 2003] et enclencher ainsi de nombreuses cascades intracellulaires (Voir Figure 1.21). Plusieurs voies ont été décrites dans différents modèles cellulaires :

- via le recrutement de la cathepsine-B, le complexe Dectin-1/SYK est internalisé par formation d'un autophagosome [Öhman et al., 2014]. Cette internalisation permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 [Gringhuis et al., 2012] et entraîne la libération d'IL-1β [Kankkunen et al., 2010] et la production de ROS [Gross et al., 2009; Underhill et al., 2005] ;
- via la protéine adaptatrice CARD9 [Gross et al., 2006], le complexe Dectin-1/SYK permet la sécrétion d'IL-2 et IL-10 [Rogers et al., 2005] ;
- la modulation du facteur de transcription NF-κB [Gross et al., 2009] et de la Caspase-8 [Gringhuis et al., 2012; Ketelut-Carneiro et al., 2018] par le complexe Dectin-1/SYK permet aussi la sécrétion d'IL-1β et d'IL-33 [Wang et al., 2018] ;
- d'autres voies dépendantes de SYK encore non-élucidées mènent à la production d'un cocktail de cytokines (IL-3, IL-4, IL-13, TNFα, MCP1, nfkbiz) dans les mastocytes [Kimura et al., 2014] (non représentées sur la Figure 1.21).

5. *Un fungus, au pluriel fungi, est un microorganisme eucaryote appartenant à une branche phylogénétique spécifique regroupant entre autres les levures, moisissures et champignons.*

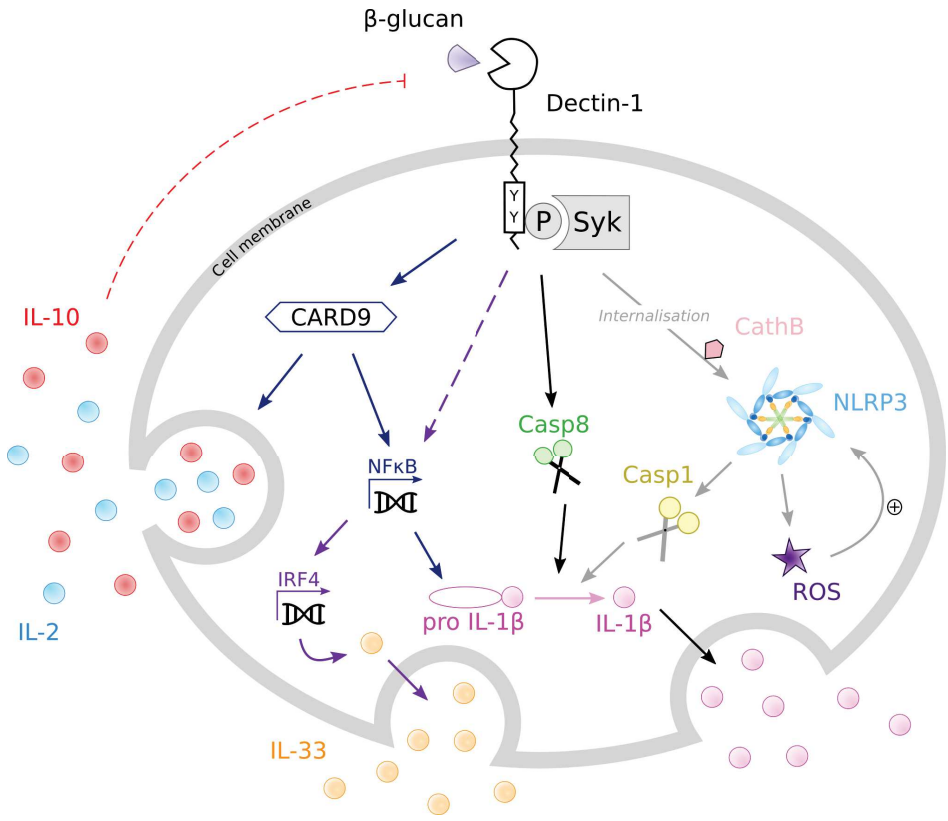


FIGURE 1.21 – **Schématisation des voies de signalisation du complexe Dectin-1/SYK** - Dectin-1 exprimé à la membrane plasmique peut interagir avec la kinase SYK et induire 4 voies de signalisation. Suite à l'internalisation du complexe (flèches grises), la voie de l'inflammasome est favorisée. D'autres voies sont possibles, celle de CARD9 (flèches bleue), d'IRF4 (flèches violettes) ou de la Caspase-8 (flèches noires). CathB, Cathepsine-B ; Casp1, Caspase-1 ; Casp8, Caspase-8.

Voies SYK indépendantes

Dans certains cas, l'activation de Dectin-1 n'induit pas le recrutement de SYK mais conduit à son interaction avec les TLRs ou les tétraspanines (TTSPAN) (Voir Figure 1.22). Ainsi, Dectin-1 et TLR2 colocalisent dans l'autophagosome contenant le zymosan [Gantner et al., 2003; Brown et al., 2003; Li et al., 2019; Patidar et al., 2020]. Cette interaction induit la production de ROS [Gantner et al., 2003; Li et al., 2019] et la sécrétion d'IL-12 et de TNF-α [Rogers et al., 2005; Gantner et al., 2003; Dennehy et al., 2008; Ferwerda et al., 2008].

Certaines des fonctions de Dectin-1, sont médiées par l'interaction avec des membres de la famille des tétraspanines telles que CD63 ou CD37. Par exemple, la phagocytose de la levure *S cerevisea*, serait dépendante de l'interaction Dectin-1/CD63 [Mantegazza et al., 2004]. L'interaction avec CD37, elle, permet de stabiliser l'expression de Dectin-1 à la membrane. Elle n'entrave pas la phagocytose du récepteur mais inhibe la production d'IL-6 [Meyer-Wentrup et al., 2007].

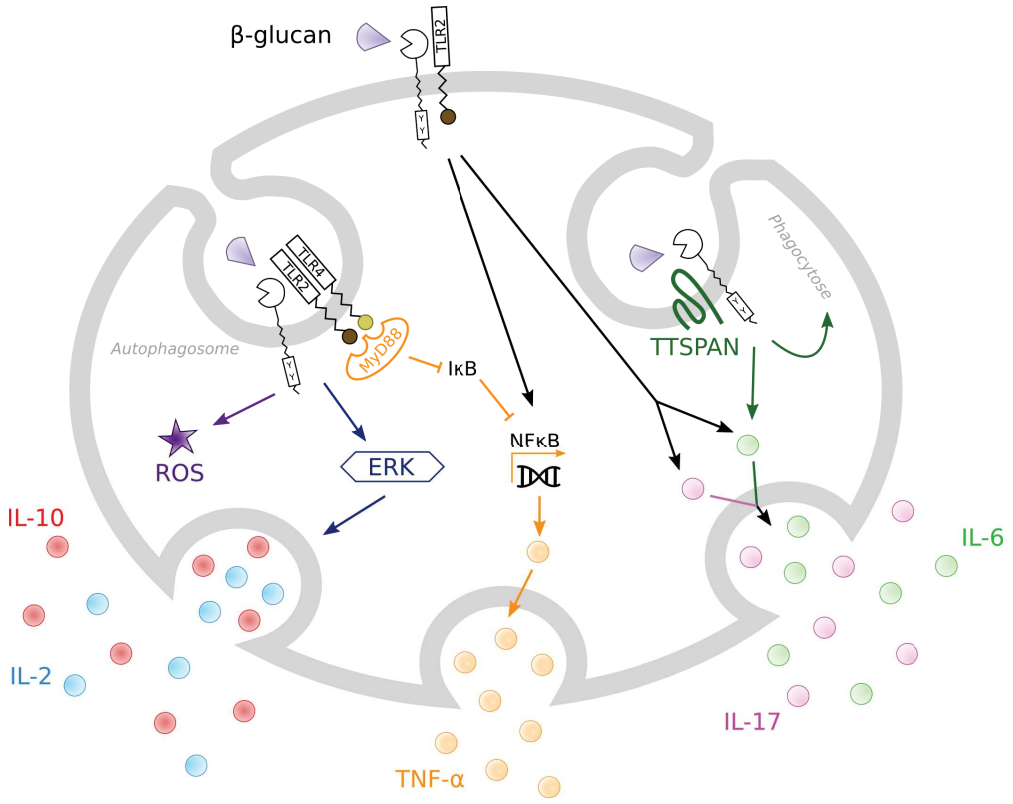


FIGURE 1.22 – **Schématisation des voies de signalisation de Dectin-1 indépendantes de la protéine SYK** - L'interaction entre Dectin-1 et les TLRs permet la sécrétion de TNF-α par l'activation de NF-κB, soit en inhibant I-κB soit en activant directement NF-κB. Cette interaction induit aussi la production de ROS, d'IL-2 et IL-10. Par ailleurs, Dectin-1 peut interagir avec différents membres de la familles des tétraspanines pour moduler la libération d'IL-6. TTSPAN, tétraspanine.

E.2.iv Fonctions à la périphérie

Si Dectin-1 est clairement impliqué dans les processus de **phagocytose** [Gantner et al., 2005; Steele et al., 2003; Brown et al., 2001], les voies intracellulaires nécessaires à ces mécanismes semblent varier selon le type cellulaire et restent à clarifier. En effet, la phagocytose dans les cellules dendritiques apparaît être dépendante de l'activation de SYK [Schorey and Lawrence, 2008], tandis que, dans les macrophages, l'activation de SYK n'est pas nécessaire [Herre et al., 2004; Underhill et al., 2005].

Suite à son activation par les β-glucanes ou le zymosan, Dectin-1 est capable d'induire la sécrétion d'un grand nombre de cytokines jouant donc un rôle pivot dans l'**inflammation** contre les pathogènes [Gantner et al., 2003; Brown et al., 2003; Rogers et al., 2005; Steele et al., 2003; Gour et al., 2018; Fan et al., 2019]. Dectin-1, de manière SYK dépendante [Underhill et al., 2005] et TLR2 indépendante [Gantner et al., 2003], est capable d'induire la production de ROS lors de l'explosion oxydative (respiratory burst) immunitaire dans les macrophages. Cette production massive de ROS permet d'induire des dommages oxydatifs au pathogène phagocyté et favorise son élimination.

De plus, Dectin-1 et les TLRs ne reconnaissant pas la même partie des parois du pathogène, la présentation tridimensionnelle de ce dernier permettrait d'induire des voies de signalisation spécifiques et complexes. Ainsi, la synergie entre Dectin-1 et les TLRs dans les phagosomes permettrait une adaptation fine de la réponse immunitaire [Li et al., 2019].

Puisque Dectin-1 favorise majoritairement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (à l'exception de l'IL-10), il semble endosser un rôle d'alarmine face aux autres cellules immunitaires et parait jouer un rôle crucial dans l'amplification de la réponse immunitaire. En interagissant directement avec les LT activés [Ariizumi et al., 2000; Grünebach et al., 2002], Dectin-1 est aussi capable d'induire leur prolifération et de libérer des signaux de co-stimulation [Ariizumi et al., 2000]. De plus, Dectin-1 induit la prolifération et la différenciation des cellules LTh, notamment en LTh17+ et permet ainsi une amplification du signal de réponse au pathogène [Gringhuis et al., 2009; Loures et al., 2015].

Du fait de son implication dans la régulation des processus inflammatoires, Dectin-1 est un élément clef de diverses **pathologies**. L'équilibre entre les effets bénéfiques et délétères de l'inflammation rendent son implication complexe. D'une part, dans l'arthrite rhumatoïde, le blocage de ce récepteur permet de réduire l'arthrite *in-vivo*, indiquant que l'activation de Dectin-1 joue un rôle délétère dans la survenue de cette pathologie [Yoshitomi et al., 2005]. Au contraire, Dectin-1 semble jour un rôle protecteur contre les allergies. En effet, chez la souris, l'expression de Dectin-1 permet de protéger contre la survenue des réponses allergiques [Gour et al., 2018]. De plus, les patients allergiques présentent un niveau d'expression de Dectin-1 réduit, et un polymorphisme de type SNP de *CLEC7A* a été associé à l'asthme [Gour et al., 2018]. Dectin-1 semble aussi impliqué dans la physiopathologie de l'infarctus du myocarde, puisque les patients victimes d'un infarctus présentent une augmentation de l'expression de Dectin-1. Plus spécifiquement, ce récepteur semble jouer un rôle délétère dans l'apparition de lésions cardiaques après l'ischémie/reperfusion, notamment en régulant la polarisation des macrophages et l'infiltration des neutrophiles. Ainsi, chez la souris Dectin-1 KO, la taille de la lésion est réduite et les souris présentent une meilleure récupération de l'activité cardiaque [Fan et al., 2019].

Enfin, Dectin-1 serait aussi impliqué dans des pathologies métaboliques telles que les diabètes, mais là encore son rôle reste controversé. Alors qu'il semble jouer des rôles protecteurs contre la survenue du Diabète de Type I [Karumuthil-Melethil et al., 2008, 2014], son activation semble délétère et favoriser le développement du Diabète de type II en induisant une polarisation des macrophages vers un type pro-inflammatoire [Cortez-Espinosa et al., 2012; Castoldi et al., 2017].

E.2.v Expression et Fonctions dans le SNC

Dectin-1 est majoritairement étudié à la périphérie en immunologie. Cette partie se base sur le peu d'études s'intéressant à Dectin-1 dans le système nerveux central.

En condition physiologique, le niveau d'**expression** de Dectin-1 dans le cerveau est faible [Taylor et al., 2002; Reid et al., 2004; Lech et al., 2012], mais ce récepteur semble exprimé majoritairement par les microglies [Shah et al., 2008; Fu et al., 2021]. En revanche, son expression cérébrale est fortement augmentée en réponse à divers stimuli [Lech et al., 2012; Ye et al., 2020; Fu et al., 2021].

In-vitro, l'activation du Dectin-1 microglial par les β-glucanes induit une **neuroinflammation** qui s'accompagne de production de ROS mais pas de sécrétion de cytokines. Le zymosan lui, en co-activant TLR2, permet d'induire l'expression de l'IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10 et TNFα [Shah et al., 2008].

In-vivo, en réponse à l'ischémie cérébrale lors d'AVC, l'expression de Dectin-1 est augmentée. Dans ce contexte, ce récepteur régule la neuroinflammation en facilitant l'activation microgliale, et conduit à une augmentation de TNFα et iNOS [Ye et al., 2020]. Bien que, comme à la périphérie, le rôle central de Dectin-1 semble de faciliter la sécrétion de diverses cytokines, les fonctions de Dectin-1 dans les microglies ne sont pas pour autant totalement comparables à celles des macrophages périphériques. En effet, tandis qu'à la périphérie Dectin-1 et les TLRs s'activent de manière synergique, dans les microglies, Dectin-1 inhibe les voies des TLRs (TLR2 et TLR4) en inhibant NF-κB, contribuant donc à diminuer la production de cytokines [Shah et al., 2009]. Enfin, dans le cas de la consommation d'un régime riche en graisse, on observe une forte expression de Dectin-1 dans la substance blanche. Cette expression semble liée à une activation délétère de la microglie qui dépend non seulement du régime mais aussi de l'âge [Yin et al., 2018].

Dectin-1 semble aussi pouvoir moduler la **dégénérescence axonale** mais ses effets semblent plutôt controversés. En effet, Gensel et al. démontrent que l'activation de Dectin-1 (mais pas de TLR2) induit une dégénérescence axonale. De plus, dans une moelle épinière intacte, des agonistes de Dectin-1 induisent une perte axonale associée à de la démyélinisation. Au contraire, Baldwin et al., démontrent que la neuroinflammation induite par l'activation de Dectin-1 permet la régénération axonale suite à un écrasement nerveux.

Enfin, comme dans les macrophages périphériques, Dectin-1 microglial est capable d'induire une **activité phagocytaire** par ces dernières [Shah et al., 2008; Maneu et al., 2011].

E.2.vi Implication dans la MA

L'expression de Dectin-1 varie en fonction de l'âge que ce soit à la périphérie [Hazy et al., 2019] ou dans les microglies [Yin et al., 2018]. Cette augmentation peut être impliquée dans des pathologies liées au vieillissement telle que la MA.

Le niveau d'expression de *Clec7a*, le gène codant Dectin-1, est augmenté dans des modèles de la MA [Hüttenrauch et al., 2018; Haure-Mirande et al., 2019; Wang et al., 2020; Lee et al., 2020]. Plus précisément, les études de RNA-seq ciblant les microglies mettent en évidence une implication de *Clec7a* dans dans le développement de la MA

[Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Mathys et al., 2017]. Dans l'étude de Krasemann et al., *Clec7a* fait partie des 20 gènes les plus sur-exprimés dans les microglies MGnD. L'augmentation d'expression de *Clec7a* semble dépendre à la fois d'*ApoE* et de *Trem2* puisque l'utilisation de KO pour ces protéines abolit totalement son augmentation. De plus, ces auteurs montrent que les microglies *Clec7a*$^+$ sont situées autour des plaques amyloïdes et sont aussi ApoE$^+$ et TREM2$^+$ [Krasemann et al., 2017].

D'un point de vue fonctionnel, Dectin-1 partage certaines voies intracellulaires avec TREM2. Ils peuvent aussi tous deux interagir de manière dynamique avec les TLRs. *In-vitro*, dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM), Dectin-1 peut compenser totalement les défauts cellulaires dus à l'absence de TREM2 [Ulland et al., 2017]. L'activation de Dectin-1 permet de restaurer l'autophagie et les niveaux d'ATP intracellulaires dans des BMDM TREM2$^{-/-}$. On peut ainsi se demander si il ne serait pas possible de compenser les effets de TREM2 en modulant Dectin-1 dans la MA ?

Les patients atteints de la MA peuvent présenter dans leur LCR et leur SNC des particules ou *Fungi* [Alonso et al., 2014, 2015; Pisa et al., 2015]. Dans le SNC, certaines espèces de *fungi* induisent une inflammation focale qui est définie par Wu et al. comme FIGG (Fungal-Induced Glial Granuloma). Dans les FIGGs, à proximité de *fungi* vivants, les microglies sont réactives, prolifératives et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1β ou le TNF-α. Ces microglies expriment Dectin-1 qui, dans ce contexte, est responsable de la phagocytose des *fungi* [Wu et al., 2019]. Dans ces conditions, les auteurs démontrent que les FIGGs induisent la production d'Aβ_{1-40} et Aβ_{1-42} solubles et que les souris infectées présentent des altérations de la mémoire spatiale [Wu et al., 2019]. Ainsi, une augmentation de Dectin-1 reflète une activation microgliale qui peut être liée à des effets bénéfiques comme la phagocytose du corps étranger.

En conclusion, l'expression de Dectin-1 est augmentée dans les microglies au cours de la MA et ce récepteur pourrait être impliqué dans des processus de phagocytose par ces cellules. Puisqu'il partage les mêmes voies de signalisation que TREM2, une cible d'intérêt majeure dans la MA, et qu'il est capable de répondre à des ligands sous leurs formes solubles ou agrégées, Dectin-1 représente une cible d'intérêt dans le contexte de la MA.

F Des nouvelles cibles de la MA, problématiques de travail

Les enjeux particuliers du stade précoce de la MA pour la découverte de thérapies innovantes (Section B.6) en font une fenêtre d'étude cruciale. Nos résultats préliminaires montrent qu'il existe une hétérogénéité microgliale, indépendante de la présence de plaques, dès les stades précoces de la pathologie. Du fait de leurs rôles à la périphérie et des pistes quant à leurs fonctions centrales, la Cystatine-F et Dectin-1 représentent des cibles de choix dans l'étude de l'initiation de la MA.

L'ensemble de ces données nous a ainsi amené à nous poser les questions suivantes :

1. les microglies peuvent elles être responsables de l'initiation de la MA ?
2. les cibles microgliales *Cst7* et *Clec7a* peuvent-elles constituer des biomarqueurs, éventuellement précoces, de la MA ?
3. *Cst7* et *Clec7a* peuvent-elles représenter des cibles d'intérêt thérapeutique ?

Pour tenter de répondre à ces questions, mon projet de thèse s'est articulé autour de 4 axes distincts mais complémentaires, dont les objectifs spécifiques étaient de :

1. Caractériser le stade précoce chez les souris APP/PS1, pour déterminer la cinétique d'apparition des caractéristiques de la MA et estimer l'impact de la microglie dans l'initiation de la pathologie ;
2. Étudier l'expression de nos cibles d'intérêt, *Cst7* et *Clec7a*, en fonction de l'âge, du décours de la MA, dans différents modèles murins et différentes conditions inflammatoires ;
3. Analyser le rôle microglial de ces cibles et essayer de comprendre comment elles pourraient moduler l'apparition ou la progression de la MA ;
4. Valider l'intérêt de ces cibles chez l'Homme.

2

Matériels et Méthodes

A Échantillons humains

Les échantillons utilisés sont issus de la banque de prélèvements de cerveaux du Dr Stephen D. Ginsberg (Center for Dementia Research, Nathan Kline Institute, Departments of Psychiatry and Neuroscience and Physiology, NYU Neuroscience Institute, New York). Ces échantillons de tissus congelés, non fixés, ont été utilisés pour une analyse transcriptomique. Les principaux paramètres des patients sont présentés dans la table 2.1.

Status	**Cas (H/F)**	**Âge Moyen (Min/Max)**	**DPM (h) moyenne ± SE**
Controles	22 (13/9)	70.32 (43/98)	14.02 ± 7.87
Parkinson	19 (7/12)	80.63 (54/91)	11.55 ± 5.96
Alzheimer	17 (10/7)	75.37 (59/96)	7.59 ± 3.15

TABLE 2.1 – **Synthèse des données des patients inclus** - Les prélèvements utilisés sont des échantillons non-fixés de cortex préfrontaux issus de différentes cohortes. DPM, Délai post mortem. H, homme. F, femme.

B Modèles animaux

La plupart des animaux utilisés durant ma thèse ont été élevés dans l'animalerie de l'IGF dans des conditions EOPS (Agrément du Ministère de l'Agriculture D34-172-13), avec un cycle jour/nuit de 12h, de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Seuls les animaux J20 ont été élevés dans l'animalerie conventionnelle de l'université de Montpellier (Agrément du Ministère de l'Agriculture E34-172-23). Ces différents modèles ont été choisis car ils présentent chacun une cinétique de développement de la pathologie qui leur est propre, et pour leur disponibilité dans les animaleries avec lesquelles nous avons travaillé.

B.1 APP^{swe}/PS1^{dE9}

Les souris APP^{swe}/PS1^{dE9}, appelées par la suite APP/PS1, sont élevées sous fond C57bl6/J. Elles sur-expriment, sous le contrôle du promoteur prion, des mutations familiales (Swedish, KM670/671NL) de l'APP ainsi qu'une délétion de l'exon 9 de la préséniline-1 (PS1) [Jankowsky et al., 2004]. Pour générer les animaux d'intérêt, nous avons croisé des mâles hétérozygotes pour les transgènes (Tg/0) avec des femelles sauvages de manière à générer dans les mêmes croisements, les souris hétérozygotes et leurs contrôles. La plupart des expériences ont été réalisées chez les femelles, les âges sont précisés selon les expériences.

B.2 $APP^{swe}/PS1^{dE9}.CX_3CR_1^{+/eGFP}$

Les souris APP/PS1 ont été croisées avec des souris $CX_3CR_1^{eGFP/eGFP}$ [Jung et al., 2000] pour visualiser les microglies grâce à la GFP. Les mâles $APP/PS1^{Tg/0}.CX_3CR_1^{+/+}$ transgéniques n'exprimant pas la GFP ont été croisés avec des femelles sauvages homozygotes pour l'eGFP $WT.CX_3CR_1^{eGFP/eGFP}$ permettant ainsi d'obtenir, à partir d'une même portée, des animaux de deux génotypes :

— $WT.CX_3CR_1^{+/eGFP}$ et

— $APP/PS1.CX_3CR_1^{+/eGFP}$.

Il faut noter, que le croisement génère des animaux présentant une haplodeficience en CX_3CR_1. Cependant, nous avons validé que cette mutation modifiait peu le développement de la pathologie dans ce modèle (Voir Annexe B).

B.3 APP^{NL-F}

Des mâles APP^{NL-F} hétérozygotes, issus de la lignée développée par l'équipe du Dr Saido (RIKEN, Japon) [Saito et al., 2014], nous ont gracieusement été fournis par l'équipe du Dr Tire-Jones (Université d'Edinburgh, Écosse). Les croisements ont été effectués entre hétérozygotes afin d'obtenir des littermates de tous les génotypes. Pour ma thèse, je ne présente que certains résultats obtenus chez des animaux âgés de 9 mois des trois génotypes (sauvage, hétérozygote, homozygote).

B.4 J20

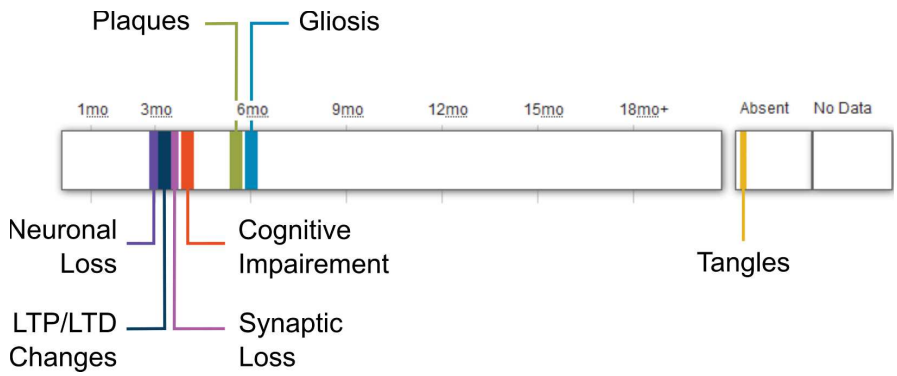


FIGURE 2.1 – **Schématisation de la mise en place de la MA dans le modèle J20** - Chronologie de la mise en place des différents marqueurs de la MA. Adapté de Alzforum.com.

Les souris J20 [Mucke et al., 2000] sont des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer (Figure 2.1). Elles expriment deux types de mutations familiales sur l'APP : la mutation Swedish (KM670/671NL) et la mutation Indiana (V717F), sous le contrôle du promoteur du PDGFB. Dans notre étude, nous avons utilisé des souris

J20 sous fond C57bl6/J. Des ARNs extraits d'hippocampes de ce modèle murin nous ont gracieusement été donnés par le Dr Catherine Desrumaux (MMDN, Montpellier). Différents âges (3, 6 et 9 mois) ont été étudiés, avec à chaque âge, une proportion similaire de mâles et de femelles.

B.5 5xFAD

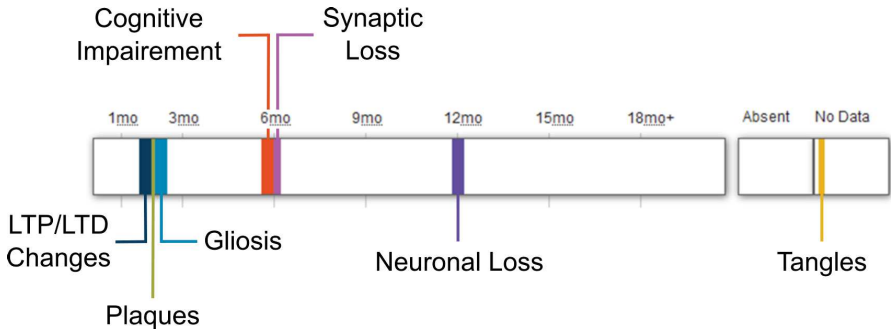


FIGURE 2.2 – **Schématisation de la mise en place de la MA dans le modèle 5xFAD** - Chronologie de la mise en place des différents marqueurs de la MA. Adapté de Alzforum.com.

Le modèle 5xFAD est un modèle sévère de développement de la MA chez lequel la pathologie se développe rapidement (Figure 2.2). En effet, sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1, les souris portent 5 mutations familiales : trois sur l'APP (Swedish KM670/671NL, Florida I716V et London V717I), et deux sur PS1 (M146L, L286V). Des mâles 5xFAD nous ont gracieusement été donnés par le Dr Sylvie Claeysen (IGF, Montpellier). Nous avons extrait l'ARN des cortex d'animaux à deux âges : 1,5 et 4 mois.

B.6 Génotypage

Le génotype des animaux APP/PS1 et APP^{NL-F} a été vérifié par qPCR. Brièvement, les biopsies sont immergées dans une solution de 25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA, puis chauffées à 95°C durant 20 min afin d'extraire l'ADN génomique. Les échantillons sont ensuite tamponnés par du Tris-HCl à 40 mM. Enfin, une qPCR classique (voir G.2) est effectuée à l'aide de primers spécifiques (voir 2.2).

C Études Comportementales

C.1 Champ ouvert ou Openfield

L'openfield permet d'évaluer la capacité locomotrice spontanée [Hall, 1934]. Les souris sont placées dans une arène d'1 m^2, bordée de parois d'une hauteur de 45 cm de

Gene	Forward	Backward	Temp (°C)
mApp WT	AGA TCT CGG AAG TGA AGA TG	TTG CCT ACC AGT TTT TGA TG	62
mAPP NL-F	GCT TGT CCT GTG TCA AAA C	TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG	62
mPs1	ACC ACC TGA GCA ATA CTG TAC G	AGG CTC CGT CTG TCG TTG	60
mCx3cr1	CCA CCT TGC CCT TCT G	TGC ACT GTC CGG TTG TT	60
mGfp	ACC TAC GGC GTG CAG T	GAA GAT GGT GCG CTC CT	60

TABLE 2.2 – Liste des primers utilisés pour le génotypage des animaux

hauteur, et divisée en 4 arènes de 250 cm^2. La lumière est ajustée à une intensité non aversive de 80 lux. Le test consiste en une session unique de 10 min durant laquelle la distance parcourue est évaluée.

Ce test permet aussi d'évaluer l'anxiété des animaux en comparant les différents paramètres (temps, distance parcourue ...) au centre de l'arène par rapport à l'arène totale. En effet, un animal anxieux aura peur du centre ouvert de l'arène et tentera de l'éviter.

C.2 Labyrinthe de Barnes

Le Barnes Maze [Barnes, 1979] permet d'évaluer la mémoire spatiale dans un environnement peu stressant. Le labyrinthe est constitué d'une plateforme circulaire blanche d'1 m de diamètre, située à 1,2 m du sol et contenant 20 trous de 50 mm de diamètre équidistants et localisés à la périphérie de la plateforme. Une "maison" cachée sous le trou cible permet à la souris de s'échapper. Des repères visuels sont placés sur les murs environnants facilitant l'orientation spatiale de la souris. Pour motiver la souris à trouver la "maison", nous avons utilisé une lumière aversive de 370 lux et, comme récompense, l'extinction de la lumière. Au début de chaque essai, la souris a été placée 10 sec dans un cylindre opaque ("prison") au centre de la plateforme (Figure 2.3 A).

Pour réduire le stress, nous avons réalisé une habituation 24 h avant le premier jour d'apprentissage (Figure 2.3). Pour l'habituation, après être libérées de la "prison" de départ, les souris sont laissées libres d'explorer la plateforme pendant 60 sec puis gentiment placées dans la "maison" dans laquelle elles sont laissées pendant 120 sec. Le séjour dans la "maison" est associé à la récompense. Pour l'apprentissage, chaque souris effectue 4 essais par jour avec un intervalle de 15 min entre les essais. Pour chaque essai, suite à sa libération de la "prison", la souris est laissée libre d'explorer la plateforme pour un maximum de 180 sec. L'essai est arrêté, soit lorsque les 4 pattes de la souris sont dans la "maison", soit lorsque le temps maximal est écoulé. Les souris qui n'ont pas trouvé la "maison" dans les 180 sec y sont gentiment placées. Les souris sont ensuite laissées 60 sec dans la "maison" avant de retourner dans leur cage. L'apprentissage est évalué sur 4 jours consécutifs.

72 heures après le 4ème jour d'apprentissage, le test de rétention mnésique est effectué. Pour ce test, la "maison" est enlevée. La souris est laissée libre d'explorer la plateforme une seule fois pendant 90 sec puis est replacée dans sa cage.

Entre chaque essai, la plateforme et les trous sont nettoyés avec attention avec de

l'éthanol 20% puis de l'eau distillée de manière à enlever les indices olfactifs. Chaque essai est enregistré via un logiciel de suivi vidéo (Ethovision XT13, Noldus). Différents paramètres ont été analysés : (i) le nombre d'erreurs réalisées (visite d'un trou différent du trou cible) avant de trouver la "maison" (Primary error), (ii) le temps pour atteindre la "maison" (Primary latency) et (iii) le temps avant d'entrer dans la "maison" (Learning latency).

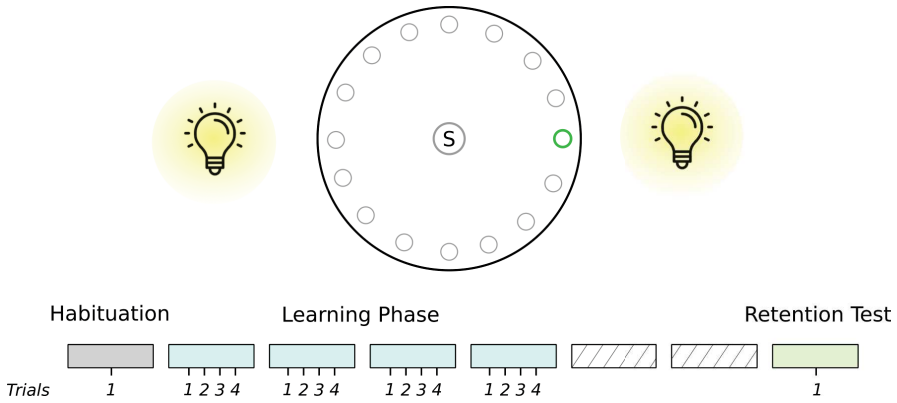


FIGURE 2.3 – **Schématisation du protocole du Barnes Maze** - Chaque rectangle représente 24h, en bleu sont représentés les jours d'apprentissage, en hachuré les jours de repos, en vert le jour de test de la rétention. S pour Start.

C.3 Hamlet

Le test du Hamlet est un test développé par le Dr T. Maurice à l'université de Montpellier, il permet d'évaluer la mémoire topographique [Crouzier et al., 2018]. Il se compose de 5 "maisons" cachées les unes des autres par des "immeubles" (en noir, Figure 2.4), mais toutes reliées par des "rues". Chaque "maison" offre une activité différente :

— Jouer (P, Play), contenant un petit labyrinthe en plexiglas ;
— Boire (D, Drink), contenant des abreuvoirs ;
— Manger (E, Eat), contenant un distributeur de croquettes ;
— Interagir (I, Interact), contenant un congénère inconnu de sexe opposé ;
— Courir (R, Run), contenant une roue.

Bien que cela nous empêche d'analyser les stratégies d'apprentissage de la localisation des différentes maisons entre les différents génotypes, pour ne pas introduire de biais d'apprentissage, nous avons choisi de réaliser cette phase du test avec les différents génotypes mélangés. La phase d'apprentissage se compose de 10 sessions journalières de 4 h, durant lesquelles les souris sont mises en groupe dans le labyrinthe et laissées libres d'explorer. Ces sessions d'apprentissage sont répétées tous les jours ouvrés durant 2 semaines. Au 14ème jour, les biberons sont retirés des cages de manière à assoiffer les souris sur la nuit. On réalise alors deux tests de rétention : à J-15 en condition assoiffé

(Water deprived, WD) et à J-16 en condition non assoiffé (Non Water Deprived, NWD). Ces tests de rétention consistent à placer les souris individuellement dans le labyrinthe durant 10 min. Différents paramètres ont été mesurés : (i) le temps mis pour atteindre les différentes maisons pour la première fois (primary latency) et (ii) le nombre d'erreur commises (primary error), c'est à dire le nombre de rues erronées empruntées (les rues correctes sont représentées en vert sur la Figure 2.4).

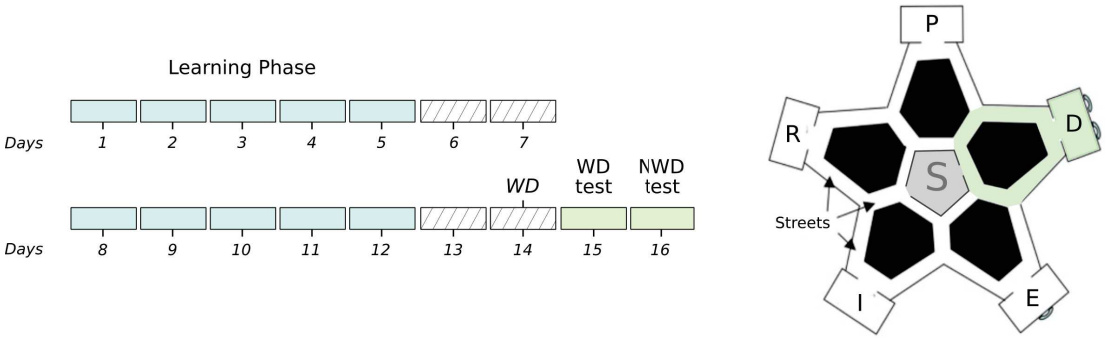


FIGURE 2.4 – **Schématisation du protocole du Hamlet** - Chaque rectangle représente 24 h, en bleu sont représentés les jours d'apprentissage, en hachuré les jours de repos, en vert les jours de test de la rétention. S pour Start, P pour Play, D pour Drink, E pour Eat, I pour Interact, R pour Run. WD pour Water Deprived. NWD pour Non Water Deprived.

D Marquages Histologiques et Immunohistochimiques

D.1 Préparation des tissus

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale avec une dose létale d'EuthasolVet (2 μg/g, TVM, *vetoEUT003AA*). Les souris ont été perfusées en intracardiaque avec 15 mL de PBS froid seulement ou suivi de 15 mL de PFA 4% (marquages Dectin-1). Le cérébrum a été disséqué de la boîte crânienne et post-fixé soit pendant 30 min à 4°C (marquages Dectin-1) soit durant la nuit (autres marquages). Les échantillons ont ensuite été transférés dans du PBS contenant 0.1% de sodium azide et stockés à 4°C jusqu'à leur coupe.

D.2 Inclusion et coupe

Cryostat : Les échantillons de tissus fixés ont été immergés dans des bains de concentrations croissantes en sucrose (10, 20 puis 30%). Le changement de bain est réalisé lorsque la concentration en sucrose est équivalente entre l'échantillon et la solution, c'est à dire lorsque l'échantillon coule. Les échantillons ont ensuite été inclus dans de l'OCT (TissueTek, *4583*) et congelés par immersion dans de l'isopentane à -50°C. Les

échantillons ainsi cryopréservés et congelés ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à leur coupe. Les coupes d'une épaisseur de 14 μm ont été réalisées sur un cryostat (Leica), récupérées dans du PBS puis montées sur des lames superfrost. Les coupes ont été stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Vibratome : Les échantillons ont été immergés dans un bain de PBS froid puis coupés au vibratome (Leica, *VT1000S*). Les coupes, d'une épaisseur de 30 μm, ont été effectuées au niveau des régions d'intérêt. Les coupes ont ensuite été stockées à 4°C dans une solution de PBS contenant 0.1% de sodium azide.

D.3 Marquage des plaques amyloïdes

Afin de visualiser les plaques amyloïdes denses, nous avons utilisé un marqueur des feuillets-β : la Thiazine Red. Les coupes flottantes ont été immergées 5 min à Température Ambiante (TA) dans une solution de Thiazine Red (Sigma, *S570435*) à 16 mg/L, sous agitation. Elles ont ensuite été rincées abondamment 3 fois avec du PBS. Dans certains cas, une immunofluorescence classique a ensuite été effectuée.

D.4 Immunofluorescence

Les coupes ont été perméabilisées et saturées pendant 1 h sous agitation à TA avec une solution de PBS contenant 20% de sérum d'âne (Gibco, *S30-100ml*) ou de chèvre (Gibco, *16210-064*) et 0.3% de Triton-X100 (Sigma, *X100-100ML*). Les coupes ont ensuite été incubées à 4°C avec les anticorps primaires choisis (Voir Table 2.3) pendant 16 à 72 h. Après 3 lavages au PBS, le marquage a été révélé en incubant les coupes avec les anticorps secondaires correspondants (Voir Table 2.3) pendant 2 h à TA sous agitation. Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS sur agitation. Si nécessaire, les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI. Les coupes ont ensuite été montées en utilisant du Dako (Dako, *S3023*) ou du ProLong Diamond antifade mountant (Invitrogen, *P36961*).

D.5 RNAScope

La détection des ARNs messagers codant pour *Cst7* et *Clec7a* a été réalisée à l'aide de sondes commerciales selon le protocole fourni par ACD (Advanced Cell Diagnostics). Le protocole standard du kit RNAscope® Multiplex Fluorescent v2 kit (ACD, *323110*) a été modifié pour permettre de combiner l'hybridation *in-situ* fluorescente (smFISH) et l'immunofluorescence classique. Toutes les incubations ont été réalisées dans le four à hybridation HybEZ. En bref, les coupes cryostat ont été stabilisées à TA avant d'être chauffées à 37°C pendant 1 h puis traitées pendant 10 min avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après 5 min de traitement dans la solution de démasquage (Target Retrieval) en ébullition, les coupes ont été rincées à l'eau distillée puis déhydratées dans l'éthanol absolu. Après une nuit de séchage, les coupes ont été traitées 30 min à 40°C avec

Cible	**Hôte**	**Fournisseur**	**Référence**	**Dilution**
Primaires				
Iba1	Rabbit	Wako	MNK4428	1/1000
Iba1	Rabbit	Abcam	AB178846	1/2000
GFP	Rabbit	Sigma	SAB4301138	1/2000
Dectin-1	Rat	Invitrogen	mabg-mdect	1/500
Amyloïde β	Souris	Biolegens	803001	1/500
Secondaires				
Hoescht	N/A	Sigma	B2883	1/5000
Rabbit CF488	Donkey	Sigma	SAB4600036-250UL	1/2000
Mouse AF647	Donkey	Molecular Probes	A31571	1/500
Rat AF594	Donkey	Jackson	712-586-150	1/500
Rat AF488	Chicken	Invitrogen	A-21470	1/1000

Table 2.3 – Anticorps pour l'immunofluorescence

la Protéase III. Après plusieurs lavages, les sondes spécifiques pour *Cst7* (ACD, Mm-Cst7, *498711*), *Clec7a* (ACD, Mm-Clec7a, *582641*), *Cybb* (ACD, Mm-Cybb, *403381*) ou la sonde contrôle négative (ACD, *320871*) ont été hybridées sur le tissu durant 2 h à 40°C. La procédure d'amplification et de révélation des signaux a été effectuée selon le protocole du kit ACD. Si nécessaire, la smFISH a été suivie d'un marquage à la Thiazine Red (voir partie D.3) et/ou d'une immunofluorescence classique (voir partie D.4). Les coupes ont finalement été montées en utilisant du ProLong Diamond antifade mountant (Invitrogen, *P36961*) puis stockées à 4°C jusqu'à la prise d'images.

D.6 Microscopie

Apotome : La plupart des images d'immunofluorescence ainsi que les images de RNAscope ont été acquises avec un microscope à épifluorescence Z1 (Zeiss) équipé d'un module apotome et d'une caméra AxioCam MR R3. Suivant l'expérience, les objectifs à air : 10X/0.3 M27 Zeiss Plan-Neofluar, 20X/0.50 M27 Zeiss Plan-Neofluar ou l'objectif à huile 40X ont été utilisés. Pour la quantification des images de RNAscope, 5 zones corticales contenant du marquage amyloïde (6E10 positif, plaques) et 10 zones corticales dépourvues de marquage amyloïde (6E10 négatif, parenchyme) ont été analysées par animal.

Confocal : Pour les illustrations ainsi que la quantification de l'expression de Dectin-1, les images ont été prises sur un microscope confocal LSM780 (Zeiss) en utilisant un objectif à huile 40X Plan Apochromat 1.3 NA. Plus spécifiquement, pour la quantification de Dectin-1, 4 mosaïques (2x2) ont été prises par animal, balayant 4 régions corticales. Chaque image a été prise en zStack sur une épaisseur de 15 μm (16 images à 1 μm d'intervalle).

D.7 Quantification

RNAscope : Pour la quantification du marquage RNAscope, nous avons adapté la *technique semi-quantitative d'ACD*. La détection des points unitaires d'ARN a été effectuée grâce au module "Spots" du logiciel Imaris v7.4.2. Pour chaque cellule un score a été déterminé en fonction du nombre de point d'ARN observés.

- Score 0 : absence de point ou <1 point/10 cellules ;
- Score 1 : 1-3 points ;
- Score 2 : 4-9 points ;
- Score 3 : 10-15 points et <10% de points en complexes ;
- Score 4 : >15 points et >10% des points sont en complexes.

Le pourcentage de microglies positives a été pondéré par leur score afin d'obtenir le H-Score du champ analysé.

$$\text{H-Score} = \sum_0^4 (\ \% \text{ microglie au score n} \times \text{n})$$

Expression de Dectin-1 en immunohistochimie : Dectin-1 pouvant être exprimé dans des microglies tronquées par la prise d'image, ou seulement dans les prolongements microgliaux, le pourcentage de microglies positives n'a pas pu être quantifié. Nous avons donc calculé le volume de marquage positif pour Dectin-1 au sein des cellules positives pour IBA1. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel Imaris v9.5.1. Brièvement, grâce au module "Surface", les volumes représentant d'une part les microglies (marquage IBA1) ou d'autre part Dectin-1, ont été reconstruits en 3D. Le script de XT "Surface-Surface colocalisation" a ensuite été utilisé pour calculer les volumes positifs à la fois pour IBA1 et pour Dectin-1.

E Biologie cellulaire

E.1 Culture de BV-2

Les cellules BV-2 représentent un modèle de cellules microgliales murines immortalisées [Blasi et al., 1990]. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 1 g/L glucose, et du pyruvate (Thermo, *21885108*), et supplémenté avec 10% de SVF préalablement décomplémenté (Biowest, *s1810-500*), 100 units/ml de pénicilline et 100 μg/ml de streptomycine. Brièvement, à chaque passage les cellules ont été rincées au PBS, décollées par une incubation courte avec de la Trypsine-EDTA à 0.05% (Gibco, *25300-054*) puis dissociées mécaniquement. La suspension cellulaire a ensuite été diluée au 40ème dans du milieu frais et ensemencée dans une nouvelle flasque.

E.2 Lignées stables modifiées de BV-2 (lignées Knock-Down ou KD)

Pour modifier le niveau d'expression des cibles, nous avons utilisé une approche lentivirale pour exprimer des shRNAs dans les BV-2. Pour chacune des cibles, 5 constructions de shRNA-PuroR ont été achetées (Sigma, *SCHLNG*). Après une amplification

par midiprep, les constructions ont été encapsulées dans des particules lentivirales avant utilisation (voir section E.2).

Appellation	**Lentivirus**	**Concentration d'utilisation**
Clec7a-KD	shRNA Clec7a - PuroR	4 μl per mL
Cst7-KD	shRNA Cst7 - PuroR	2 μl per mL
Contrôles	GFP - PuroR	3 μl per mL

TABLE 2.4 – Concentration et lentivirus utilisés

Production de lentivirus DJ : Des cellules HEK293T+ ont été transfectées au phosphate de calcium avec (1) le plasmide codant pour l'enveloppe virale (PMD2g, équipe Rassendren p1472), (2) le plasmide d'assemblage (PsPx2, équipe Rassendren p1473) ainsi que (3) le plasmide d'intérêt. 6 h après la transfection, le milieu cellulaire a été remplacé par du milieu contenant 1% de SVF. 72 h après la transfection, les surnageants cellulaires contenant les particules lentivirales ont été collectés puis filtrés (Millex, *SLHV033RS*). Du PEG6000 (Sigma, *81253-1KG*) a été ajouté et les surnageants ont été incubés à 4°C toute la nuit pour précipiter les particules lentivirales. Ces dernières ont ensuite été collectées par une centrifugation de 30 min à 2 600 g et 4°C, puis resuspendues dans du PBS et stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Création de lignées stables sous-exprimant les cibles par shRNA : Les BV-2 ont été transduites avec les lentivirus shRNA, puis sélectionnées par un traitement avec 5 μg/mL de puromycine (Sigma, *P9620-10ml*). Après plusieurs passages d'amplification, ces 10 lignées stables ont été évaluées par qPCR. Nous avons mesuré à la fois l'efficacité sur le niveau d'expression de la cible et les effets non spécifiques. Pour chaque cible, le meilleur shRNA a été retenu (Figure 2.5).

E.3 Conditionnement au LPS

Si nécessaire, les cellules ont été conditionnées par un traitement par 500 ng/ml de LPS (Lipopolysaccharide, Sigma, L4516-1MG) pendant 24h.

E.4 Phagocytose

La capacité phagocytaire des cellules a été évaluée à l'aide de différents substrats. Dans chacun des cas, les cellules ont été ensemmencées 24 h avant l'expérience à une concentration de 65 000 cellules/mL.

Nous avons utilisé des substrats couplés à des fluorophores. Ainsi, les cellules ont été incubées avec soit des billes de latex d'1 μm de diamètre couplées à un fluorophore-rouge (Merck, *L2778* ; 0.0012%), du zymosan-594 (Thermo, *Z23374* ; 10 μg/ml) ou de

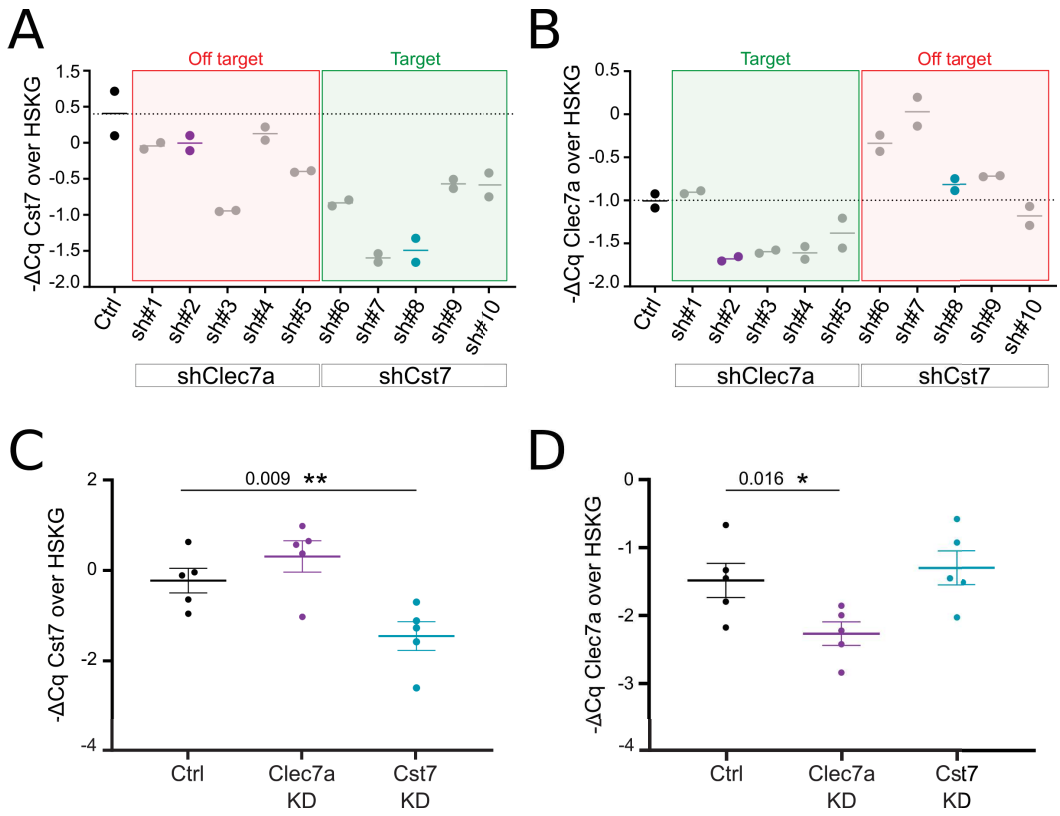


FIGURE 2.5 – **Efficacité des shRNA exprimés dans les BV-2** - qPCR de cellules BV-2 issues de différentes lignées. **(A, B)** Screening de l'effet cible sur l'ensemble des lignées shRNA. Niveau d'expression de **(A)** *Cst7* ou **(B)** *Clec7a* dans les 10 lignées shRNA. **(C, D)** Validation des lignées shRNA choisies. Niveau d'expression de **(C)** *Cst7* ou **(D)** *Clec7a* dans la lignée contrôle (Noire), *Clec7a*-KD (Lavande) ou *Cst7*-KD (Turquoise), Student t-test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

l'Aβ-555 (Anaspec, *AS-60480-01* ; 20 μM) durant 24 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS puis fixées à la PFA 1% durant 10 min.

L'analyse du pourcentage de cellules positives pour chaque type de particule a été effectuée à l'aide du logiciel Imaris. Brièvement, pour chaque type de particule, un seuil de détection a été déterminé et conservé au cours des différentes expériences. Les particules ont ensuite été détectées à l'aide du module "Spots". Le nombre de cellules par champ a été compté automatiquement avec l'utilisation du module "Surface" permettant la reconstruction des noyaux cellulaire (marqués au DAPI). Les particules intra-cellulaires ont ensuite été détectées manuellement grâce au marquage IBA1 délimitant la membrane cellulaire.

E.5 Lysosensor, analyse du pH des organelles intracellulaires

Le lysosenseur Yellow/Blue DND-160 (invitrogen, *L7545*) est un senseur ratiométrique permettant de mesurer le pH des organelles intracellulaires telles que les endosomes et lysosomes. Ce senseur est une base faible capable de traverser la membrane plasmique et de se lier aux ions H^+. En réponse à cette liaison, le senseur produit soit

une fluorescence bleue (dans un milieu neutre) soit une fluorescence jaune (dans un milieu acide). Les protocoles utilisés ont été adaptés de Ma et al.

24 h avant l'expérience, les différentes lignées de BV-2 (décrites section E.1 et section E.2) ont été ensemencées à 150.10^3 cellules/ml dans des plaques 96 puits noires, à fond transparent. Les solutions tampons (125 mM KCl, 25 mM NaCl, 25 mM HEPES ou MES, 20 μM Nigericine, 20 μM Gramicidine) de pH 3.5 à 7.5 ont été préparées extemporanément et utilisées pour déterminer la courbe de calibration.

Les cellules ont été incubées pendant 3 min à 37°C dans une solution de 3 μM Lysosensor (invitrogen, *L7545*) dilué dans du milieu de culture chaud. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois avec une solution de PBS. Pour les puits servant à la courbe de calibration, les cellules ont été rincées avec la solution solution tamponnée au pH déterminé puis incubées pendant 10 min à 37°C avec la solution au pH calibré. Pour les puits expérimentaux, les cellules ont été maintenues dans du PBS.

Les lectures des fluorescences ont été réalisées en utilisant un lecteur de plaque Spark (Tecan). La fluorescence "bleue" a été mesurée à 440 nm $\pm$ 10 nm (Excitation à 329 nm $\pm$ 10 nm), et la fluorescence "jaune" à 540 nm $\pm$ 10 nm (Excitation à 384 nm $\pm$ 10 nm). Le ratio des intensité de fluorescence "bleue" et "jaune" a ensuite été calculé permettant, grâce à la courbe étalon, de déterminer le pH moyen des organelles intracellulaires.

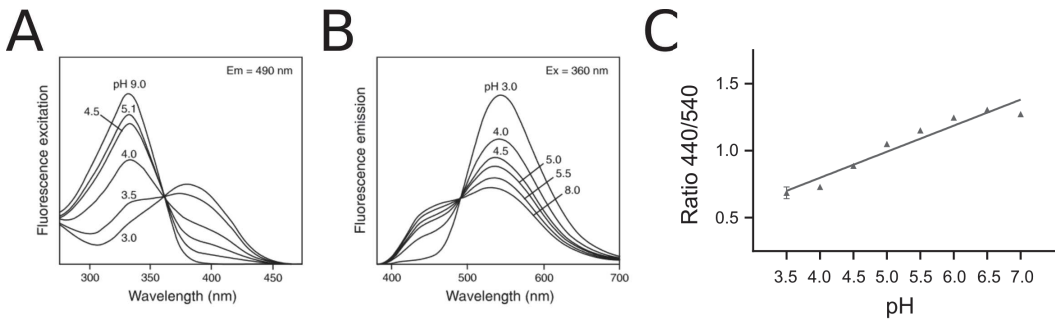


FIGURE 2.6 – **Caractéristiques des fluorescences du lysosenseur utilisé - (A)** Représentation des pics d'excitation pour une lecture à différentes longueurs d'onde. Pic d'excitation à 330 nm. **(B)** Représentation des pics d'émission pour une lecture à différentes longueurs d'onde. Pic d'émission à 540 nm. **(C)** Représentation d'une courbe étalon montrant l'évolution du ratio des fluorescences en fonction du pH de la solution.

F Analyses Biochimiques

Pour les analyses biochimiques sur tissus, nous avons utilisé l'ensemble du cortex et non pas une région spécifique.

F.1 Mesure de la concentration en IL-1

Les HEK blue IL-1R (invivogen, *hkb-il1r*) sont des cellules HEK modifiées permettant d'évaluer la concentration en IL-1 (α et β) présente dans le surnageant cellulaire. En effet, ces HEK ont été ingénieurisées de manière à (1) exprimer les récepteurs de l'IL-1 murin et humain, puis (2) détecter son activation à l'aide d'un rapporteur, la phosphatase alkaline.

En pratique, les surnageants cellulaires à tester ont été concentrés à l'aide d'une colonne amicon (Millipore, *UFC5010BK*) de manière à améliorer la sensibilité de détection de IL-1. 20 μL de ce concentrat a été incubé avec des HEK-Blue durant 16 h. Le surnageant de ces HEK-Blue a ensuite été incubé avec la solution Quanti-BlueTM (Invivogen *rep-qbs*) durant 2 h à 37°C pour déterminer, par mesure à 640 nm sur un Tecan, la quantité de phosphatase alkaline produite par les HEK-Blue. La concentration initiale en IL-1 a ensuite été calculée en normalisant par rapport à une gamme étalon réalisée en parallèle.

F.2 Préparation de synaptosomes

Les cortex ont été dissociés, sur glace, mécaniquement à l'aide d'un mini potter dans une solution de Syn-PER (Thermo, *87793*) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PI, 1X, thermo, *A32961*) à la concentration de 10 mL/g de tissus. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 1 200g, 4°C durant 10 min. Le surnageant ainsi préparé (Homogénat) a été séparé et une partie centrifugée à 15 000g, 4°C durant 20 min. Le surnageant de la deuxième centrifugation correspond à la fraction cytosolique et est conservé à -20°C. Le culot, correspondant à la fraction des synaptosomes, a été resuspendu avec du Syn-PER + PI à la concentration de 1 mL/g de tissu initial. Les concentrations en protéines des échantillons ont été déterminées par un dosage BCA (BiCinchoninic acid Assay).

F.3 Western Blot

Les échantillons protéiques contenant 25 μg de protéines ont été repris dans le tampon de dénaturation NuPAGE LDS buffer, (Thermofisher, *NP0007*) supplémenté avec 5% de β-mercaptoéthanol (Sigma, *M7145-100ML*). Après dénaturation à 80°C pendant 5 min, les échantillons ont été déposés sur des gels 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, *NW04125BOX* ou Sigma, *PCG2003-10EA*). La migration des protéines a été réalisée à 100 V dans le tampon de migration MOPS, jusqu'à séparation des poids moléculaires d'intérêt.

Le transfert semi-liquide a été effectué grâce à un iBlot (Thermo, *IB21001*). Après vérification du transfert par une coloration au Ponceau, les membranes ont été saturées dans une solution de PBS contenant 0.1% de Tween-20 (PBS-T) et 5% de lait écrémé, pendant 1 h à TA sous agitation. Les anticorps primaires choisis (voir Table 2.5) ont été appliqués sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS-T, les membranes ont été incubées 2 h à TA avec les anticorps secondaires correspondants (voir Table 2.5) et lavées 3 fois

Cible	Hôte	Fournisseur	Référence	Dilution
Primaires				
Synaptophysine	Souris	BD Biosciences	611880	1/10000
NR1a	Souris	Synaptic Systems	114 011	1/1000
Homer	Lapin	Synaptic Systems	160 003	1/1000
PSD95	Lapin	Genetex	GTX133091	1/4000
Actine	Souris	DSHB	JLA20	1/2000
Secondaires				
Souris HRP	Cheval	Cell Signaling	7076S	1/5000
Lapin HRP	Chèvre	Jackson	111-035-144	1/5000

Table 2.5 – Anticorps pour Western Blot

au PBS-T. Enfin, la peroxidase a été révelée par une incubation de 5 min avec de l'ECL (Biorad, *170-5061*), et le signal lu sur un Chemidoc Touch (Biorad).

F.4 ELISA MSD®

Afin de limiter la perte en amyloïde, toutes les étapes pour l'ELISA ont été effectuées dans des tubes LoBind (Eppendorf, *022431081*).

Chemical	Buffer 1	Buffer 2
Tris-HCl (sigma, *T2788*)	50mM	50mM
PI (thermo, *A32961*)	1X	1X
NaCl (sigma, *S5886*)	150mM	-
Triton X-100 (sigma, *066K0089*)	1%	-
Guanidine (sigma, *G7294-100ML*)	-	5M
pH	7.4	8

Table 2.6 – Composition des tampons pour la préparation des échantillons pour l'ELISA MSD

Les échantillons de cortex ont été pesés et 2.5 μl de Tampon 1 (Table 2.6) par mg de tissus ont été ajoutés. Les échantillons ont été ensuite soniqués (7 pulses à 40% d'amplitude) puis centrifugés à 17 500g, 4°C durant 20 min. Le surnageant correspondant à la fraction Triton-soluble (contenant les amyloïdes non agrégés) a été dosé et conservé à -80°C. Le culot a été resuspendu avec 100 μl de Tampon 2 (Table 2.6) et agité à 800 rpm, 22°C durant 3 h (Starlab, Mixer-HC). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 17 500g, 4°C durant 20 min. Le surnageant correspond à la fraction Guanidine-Soluble (contenant les amyloïdes agrégés). Les concentrations protéiques des deux fractions, soluble et insoluble, ont été mesurées par un dosage BCA. Les échantillons ont ensuite été dilués (voir Table 2.7) avec le Diluent 35 fourni dans le kit de manière à rester dans la

fenêtre de détection du kit.

Age	Triton-Soluble (μg/μl)	Guanidine-Soluble (amyloïde agrégé, μg/μl)
3 mois	200	20
4 mois	2	0.2
6 mois	0.4	0.012
9 mois	0.2	0.006

TABLE 2.7 – Concentrations des fractions solubles dans le triton ou la guanidine utilisées en fonction de l'âge des souris APP/PS1

Pour la détection à proprement dite, nous avons suivi le protocole recommandé par le fabriquant du Kit multiplex Aβ peptide panel 6E10 (MSD, *K15200E*). Brièvement, les puits ont été incubés avec du Diluent 35 à TA pendant 1 h avec une agitation de 300 rpm puis rincés 3 fois avec de la solution de lavage (PBS + 0.05% Tween-20). Dans chaque puits, on a alors déposé la solution de détection (6E10 2% + bloqueur Aβ40 1% dilués dans du Dilent 100) puis les échantillons. Après une incubation de 2 h à TA sous agitation à 300 rpm, la plaque a été rincée 3 fois avec la solution de lavage, et les puits recouverts de solution de lecture (Read Buffer T dilué à 2X). La lecture a été effectuée sur le MESO QuickPlex SQ 120.

G Analyses transcriptomiques

G.1 Extraction d'ARN

Le cortex des animaux perfusés (Section D.1) a été isolé et placé dans des tubes à billes (MPBio, *116913050-CF*) pour faciliter leur homogénéisation. Les tubes ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Le jour de l'extraction, les tissus ont été homogénéisés par agitation à 4 m/s pendant 20 sec dans un homogénéiseur MPBio (MPBio, *FastPrep-24 Classic*).

Pour les cellules, les suspensions ont été homogénéisées mécaniquement à la pipette.

Les extractions d'ARN des tissus ou des cellules ont été effectuées en suivant les recommandations du kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, *74136*). Les échantillons homogénéisés ont été transférés dans une colonne gDNA eliminator et centrifugés à 11 000 g pendant 30 sec. L'ARN a été précipité par ajout d'un volume équivalent d'éthanol 70% puis les échantillons ont été centrifugés dans une colonne RNeasy à 11 000g pendant 15 sec. Après différentes étapes de lavage avec les solutions RW1 et RPE, les échantillons ont été élués avec de l'eau RNAse/DNAse Free. La concentration des échantillons a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop2000 (Thermo). La qualité des ARNs a été vérifiée sur un 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). Tous les échantillons utilisés présentaient un RIN supérieur à 8, exceptés certains échantillons humains dont le RIN était néanmoins

supérieur à 7.

G.2 qPCR

Les ARNs ont d'abord été rétrotranscrits en ADN complémentaires en utilisant le kit iScript reverse transcriptase (Biorad, *1708891BUN*). La qPCR a ensuite été réalisée avec des primers spécifiques (Table 2.8) sur un LightCycler480 (Roche). La détection des Cq a été réalisée de manière automatique en utilisant le calcul de la dérivée seconde de la courbe d'amplification du logiciel LightCycler. L'expression génique a été normalisée par rapport aux gènes de ménage appropriés. Les expressions relatives sont exprimées sous forme -ΔCq. Ainsi plus un gène est exprimé, plus la valeur de son -ΔCq est grande.

$$-\Delta\text{Cq} = -(\,\text{Cq}\,[\,\text{gène d'intérêt}\,] - \text{Cq}\,[\,\text{gene(s) de référence}\,]\,)$$

Pour une meilleure lisibilité de certains résultats, nous avons aussi parfois utilisé le z-Score permettant de mettre en évidence des variations par rapport à une moyenne.

$$\text{z-Score} = \frac{-\Delta Cq - Moyenne}{SD}$$

H Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués dans le logiciel Prism v8.3.1. Si nécessaire, les données aberrantes ont été retirées à l'aide du module "Identify outliers".

La normalité des données ou des résidus a été testée par le test de Shapiro-Wilk. Quand les données ou les résidus suivaient une distribution normale ($p>0.05$), un test paramétrique a été utilisé, sinon nous avons utilisé un test non-paramétrique.

Plus spécifiquement, nous avons utilisé :

- Comparaison de deux groupes (ex : APP/PS1 vs WT) : Student t-test ou Mann-Whitney ;
- Comparaison de plus de deux groupes (ex : 3 lignées shRNA) : One-Way ANOVA ;
- Comparaison de deux groupes (ex : APP/PS1 vs WT) avec des données répétées selon un facteur (ex : WD vs NWD) au sein des groupes : Two-Ways ANOVA.

Dans le cas des ANOVAs à une ou deux dimensions, les valeurs de p ont été corrigées pour tenir compte des comparaisons multiples. Plus spécifiquement, nous avons utilisé la méthode classique du FDR (False Discovery Rate) de Benjamini et Hochberg qui limite la sur-correction tout en contrôlant le risque de faux-positifs (False discovery).

Le seuil de significativité a été placé à 5%.

Gene	Forward	Backward
mApoe	AGA CCC TGG AGG CTA AGG AC	AGA GCC TTC ATC TTC GCA AT
mCcl2	Quantitec ref QT00167832	
mCcl12	CCA TCA GTC CTC AGG TAT TGG	CTT CCG GAC GTG AAT CTT CT
mCd68	GAC CTA CAT CAG AGC CCG AGT	CGC CAT GAA TGT CCA CTG
mCd72	AGC GCA TCT AAC CAT CTA GGA C	GCT TTG TCC GCT AGT GCA G
mCd86	GAG CGG GAT AGT AAC GCT GA	GGC TCT CAC TGC CTT CAC TC
mClec7a	AGA GTG AAG GGC CAT GGT T	GAG CTG TAT TTC TGA CTT GAA ACG
hCLEC7A	CCA GGA TAG CTG TTG TTT CAG AG	CCA AGC ATA GGA TTC CCA AA
mCst7	ATG TCA GCA AAG CCC TGG TA	GGT CTT CCT GCA TGT AGT TCG
hCST7	TCT GCT GCC TGG TCT TGA G	TCA CAC GTG AGT TAA GGT CCT G
mCtsd	CCC TCC ATT CAT TGC AAG ATA C	TGC TGG ACT TGT CAC TGT TGT
mCxcl10	GCT GCC GTC ATT TTC TGC	TCT CAC TGG CCC GTC ATC
mCybb	GCC ACC AGT CTG AAA CTC AAA	CAG GTC TGC AAA CCA CTC AA
mH2-aa	CTC TGA TTC TGG GGG TCC T	ACC ATA GGT GCC TAC GTG GT
mHexb	TTT GGC AAG AAG TTT TTG ATG A	TTC CAC ACT TCG ACT ACT GTG C
mHprt1	GCA GTA CAG CCC CAA AAT GG	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT
mIl1b	CTG GTG TGT GAC GTT CCC ATT A	CCG ACA GCA CGA GGC TTT
mMyd88	GAG GAT ATA CTG AAG GAG CTG AAG TC	CCT GGT TCT GCT GCT TAC CT
mNlrp3	TTC CCA GAC ACT CAT GTT GC	ACC ACG GCA GAA GCT AGA AG
mOaz1	CTC TGC CTG AGG GCA GTA AG	AGT AGG GCG GCT CTG TCC
mP2ry12	CGG TAC TTA TCT CTA ACT AGC TTT GA	TTG GTA ATT GTA GTT GCT TAT GTT TTC
mSyk	AGC TTC GGA GTC CTG ATG TG	TCA CTT CGC TCC CTT TCA TC
mTgfb	CTT TTG ACG TCA CTG GAG TTG	CAG TGA GCG CTG AAT CGA A
mTmem119	GCA TGA AGA AGG CCT GGA C	CTG GGT AGC AGC CAG AAT GT
mTnfa	GAC CCT CAC ACT CAG ATC ATC TTC T	CCT CCA CTT GGT GGT TTG CT
mTrem2	TGG GAC CTC TCC ACC AGT T	GTG GTG TTG AGG GCT TGG
mTyrobp	TGG TGT TGA CTC TGC TGA TTG	GTC TCA GCA ATG TGT TGT TTC C

Table 2.8 – Liste des séquences des primers utilisés en qPCR.

3

Résultats

Avant propos

Au cours de ma thèse j'ai travaillé sur divers projets de recherche qui ont soit servi à la mise en place du projet que je présente, soit serviront pour la suite du projet. J'ai aussi participé à des projets en collaboration, mentionnés dans ma liste de publication (Annexe C).

Dans les paragraphes ci-dessous, je présente brièvement les principaux projets auxquels j'ai participé, leurs objectifs ainsi que mon implication personnelle au sein de ces projets.

— Projet n°1 : **Caractérisation du modèle APP^{swe}/PS1^{dE9}.CX$_3$CR$_1^{+/eGFP}$.** Les souris CX$_3$CR$_1^{+/eGFP}$ sont couramment utilisées pour analyser les rôles des microglies, que ce soit dans des contextes physiologiques ou pathologiques. En effet, chez ces souris un des deux allèles codant pour CX$_3$CR$_1$ est remplacé par la GFP, ce qui facilite l'analyse des microglies notamment pour ce qui concerne les analyses spatiales. Néanmoins, par construction ces souris présentent aussi une haplodéficience pour CX$_3$CR$_1$, un récepteur crucial pour la microglie.
L'objectif du projet a donc été de caractériser la mise en place de la MA à 4, 8 et 12 mois chez les mâles et les femelles de cette lignée afin de mesurer l'impact de l'haplodéficience en CX$_3$CR$_1$ dans le modèle APP^{swe}/PS1^{dE9}. Ce projet était crucial car l'utilisation des souris APP^{swe}/PS1^{dE9}.CX$_3$CR$_1^{+/eGFP}$ était nécessaire à la réalisation du projet n°2. Notre analyse a permis de démontrer que l'haplodéficience en CX$_3$CR$_1$ a un impact négligeable sur la mise en place des différentes caractéristiques (au niveau comportemental, histologique et moléculaire) de la MA, et nous a donc permis de valider que ces souris représentent un bon modèle pour l'étude des microglies de cette pathologie. Ce projet a aussi été l'occasion d'évaluer de manière détaillée l'impact du sexe sur l'évolution de la pathologie dans le modèle APP^{swe}/PS1^{dE9}.
Pour ce projet j'ai réalisé une grande partie des expériences de comportement, des marquages immunohistochimiques puis j'ai analysé et compilé l'ensemble des résultats. J'ai aussi réalisé l'ensemble des figures et participé à la rédaction du manuscrit (matériel et méthode, légendes des figures). Ce projet a fait l'objet d'une **publication** dont je suis co-premier auteur [Hemonnot-Girard et al., 2021] (Annexe B).

— Projet n°2 : **Analyse du transcriptome microglial au cours du développement de la MA**. La diversité des cellules microgliales est au coeur de la complexité des rôles fonctionnels de ces cellules. Établir et analyser cette diversité est donc un pré-requis indispensable pour comprendre les rôles des microglies dans le développement de la MA. Dans cette pathologie, on distingue facilement deux grands sous-types de cellules microgliales : les microglies associées aux plaques amyloïdes qui présentent un phénotype réactif et les microglies non-associées aux

plaques dont la morphologie est très proche des microglies homéostatiques.
L'objectif de ce projet a donc été de comparer le transcriptome de ces deux sous-populations microgliales afin de comprendre leurs rôles respectifs dans la pathologie. Nous avons aussi cherché à déterminer comment évoluait leur transcriptome respectif avec la progression de la MA à 4, 8 et 12 mois. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les microglies associées aux plaques présentent un profil pro-inflammatoire marqué et affectent la transmission synaptique. De manière originale, elle nous a également permis de montrer que les microglies qui ne sont pas associées au plaques présentent des altérations moléculaires démontrant un rôle actif dans le développement de la pathologie. En particulier, cette étude a permis de mettre en lumière une altération précoce du transcriptome microglial dans les cellules non-associées aux plaques. Plus spécifiquement, ce projet nous a permis de mettre en évidence de nouvelles cibles microgliales dans les stades précoces de la MA. Ce projet sert donc de fondation à mon projet principal de thèse, le projet n°3.
Pour ce projet j'ai réalisé les expériences de validation des cibles en RNAscope et immunohistochimie. J'ai aussi réalisé l'ensemble des figures et participé à la rédaction du manuscrit (matériel et méthode, légendes des figures). Ce projet fait l'objet d'une **publication** en cours de soumission dont je suis co-premier auteur.

— Projet n°3 : **Caractérisation de la pathologie à une âge précoce (4 mois) chez les souris APP^{swe}/PS1^{dE9} et implication des cibles microgliales *Cst7* et *Clec7a* dans la progression de la MA**. Il s'agit du projet principal que je présente dans ce manuscrit dont vous connaîtrez les tenants et aboutissants dans les prochaines pages.
Le manuscrit correspondant à ce travail est en cours de rédaction, il devrait être soumis d'ici la fin de l'année 2021. Je suis en charge de la rédaction de la première version de l'ensemble de ce manuscrit et j'en serai le premier auteur.

— Projet n°4 : **Caractérisation du modèle APP^{NL-F}**. Notre compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA repose en grande partie sur des modèles animaux, qui présentent chacun des avantages et des inconvénients (voir introduction section B.5.i). L'un des inconvénients majeurs des modèles dits de 1re génération (cf. modèles transgéniques) est qu'il conduisent à une sur-expression de la protéine APP et de ses produits de dégradation. Récemment de nouveaux modèles KI, dits de 2nde génération ont été développés. Ces modèles représentent des modèles plus physiopathologiques de la MA. Pour la suite du projet sur la caractérisation des rôles microgliaux de Dectin-1 dans le développement de la pathologie, nous avons choisi de changer de modèle murin de la MA et de passer sur le modèle APP^{NL-F} développé par le Dr Saido [Saito et al., 2014].
Ce modèle a été partiellement caractérisé dans la littérature mais les données, notamment en termes de réaction inflammatoire, au stade précoce restent très parcellaires. Ce projet a pour objectif de caractériser la mise en place des carac-

téristiques (au niveau comportemental, histologique et moléculaire) de la MA à 3, 6 et 9 mois chez les mâles et les femelles, et dans les trois génotypes (sauvage, hétérozygote et homozygote). Notre objectif est de définir le stade précoce dans ce modèle. La détermination du stade précoce est crucial pour pouvoir, par la suite, étudier l'implication de Dectin-1 dans la mise en place de la MA (voir Section C).

Durant l'un de mes stages d'été, j'avais déjà eu l'occasion de travailler avec ces souris, j'ai donc participé à leur import et j'ai réalisé l'analyse bibliographique permettant le design du projet dans son ensemble. Je gère la colonie et ai réalisé une grande partie des expériences de comportement. J'encadre en partie un étudiant de Master travaillant sur ce projet. J'ai aussi réalisé certaines des analyses transcriptomiques. Enfin, j'analyse et compile l'ensemble des résultats.

Ces données sont encore en cours d'acquisition mais devraient être soumises d'ici la fin de l'année 2021, début 2022. Je serai premier auteur de ce manuscrit.

Dans un soucis de fluidité de lecture et de cohérence, j'ai fait le choix personnel de ne présenter, dans la partie résultats, que les résultats du projet n°3. Les projets n°1 et n°2 ont été mentionnés en introduction en tant que fondement de mon travail de thèse. Le projet n°4 est mentionné dans la partie perspective.

A Caractérisation du modèle APP/PS1 au stade précoce

Le modèle APP/PS1 est un modèle très utilisé pour décortiquer les mécanismes impliqués dans la progression de la MA. Bien que faisant l'objet d'un très grand nombre d'études, ce modèle a majoritairement été caractérisé entre 8 et 12 mois, des âges intermédiaires et tardifs. Dans la littérature, les âges autour de 6-8 mois sont considérés comme des stades précoces car ils correspondent au début des défauts cognitifs et à l'apparition des plaques.

Nos résultats de transcriptome (Section D.3, publication en préparation) démontrent un remodelage microglial dès 4 mois. Comme cet âge est très peu étudié dans la littérature, j'ai commencé par caractériser la mise en place de la MA dans ce modèle à cet âge. Cette caractérisation a été principalement faite chez les femelles, néanmoins certains résultats incluent des mâles et des femelles ou seulement des mâles, à chaque fois le sexe des animaux est précisé.

A.1 De multiples défauts comportementaux

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si des déficits comportementaux se mettent déjà en place à 4 mois.

Hyperactivité locomotrice et anxiété

Nous avons d'abord caractérisé des comportements simples comme la locomotion. Nous avons aussi analysé l'état d'anxiété des animaux.

Dans la littérature, l'âge et l'apparition d'une hyperlocomotion chez les APP/PS1 est débattu. Alors que certains groupes ne mesurent aucune hyperlocomotion, que ce soit à 4 mois [Bonardi et al., 2011] ou à 7 mois [Lalonde et al., 2004; Sierksma et al., 2014], au contraire, d'autres groupes mesurent une faible hyperactivité locomotrice dès 5 et 6 mois [Da Silva et al., 2016; Kelly et al., 2017].

Nous avons donc quantifié l'activité locomotrice des femelles APP/PS1, à 4 mois, dans l'openfield. Dès cet âge précoce et comparé aux contrôles du même âge, nous avons mesuré une hyperactivité locomotrice chez les souris transgéniques (Figure 3.1 A-B).

Différents groupes s'accordent à dire qu'à 7 mois, les APP/PS1 sont moins anxieuses que les contrôles [Lalonde et al., 2004; Reiserer et al., 2007; Sierksma et al., 2014]. L'anxiété chez les souris de 4 mois, a été évalué en mesurant le temps passé au centre de l'openfield. Nos résultats montrent qu'à cet âge, les femelles APP/PS1 ne semblent pas présenter de modification de leur état d'anxiété (Figure 3.1 C).

Déficits d'apprentissage et de mémoire

Ensuite, nous nous sommes intéressées aux capacités cognitives des souris, car elles constituent des indicateurs du développement de la MA. Plus spécifiquement, grâce à

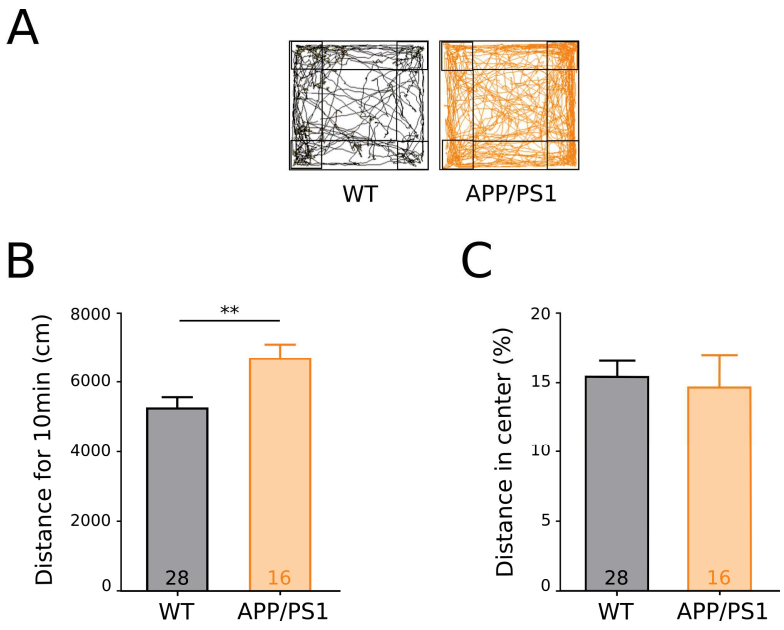


FIGURE 3.1 – **Les femelles APP/PS1 à 4 mois montrent une hyperlocomotion mais pas d'anxiété - (A)** Tracé représentatif pour les femelles WT (Gris) ou APP/PS1 (Orange) à 4 mois. **(B)** Quantification de la distance parcourue (cm) en 10 min pour les WT (Gris, n=28) et les APP/PS1 (Orange, n=16). Moyenne ± SEM. Student t-test, ** p<0.01. **(C)** Quantification du pourcentage de distance parcourue dans le centre de l'arène par rapport à la distance totale. Moyenne ± SEM.

deux tests comportementaux, le Barnes Maze et le Hamlet [Crouzier et al., 2018], nous avons mesuré les capacités d'apprentissage et la mémoire topographique.

Lors de la phase d'apprentissage du test du **Barnes Maze**, bien que toutes les souris soient capables d'apprendre la tâche (Effet jour, Two-Ways ANOVA, p<0.001 ###), les femelles APP/PS1 présentent un retard d'apprentissage dès le 2ème jour, qui persiste jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 3.2 A).

Nous avons ensuite testé la mémoire topographique à 72h. Dans ce contexte, nous avons réalisé deux comparaisons, l'une entre les deux génotypes et l'autre, au sein du même génotype, entre les performances au dernier jour d'apprentissage et lors du test de rétention. La comparaison des deux génotypes permet de mettre en évidence que les souris APP/PS1 commettent plus d'erreurs que les contrôles lorsqu'il s'agit de retrouver l'emplacement initial de la "maison" (Figure 3.2 B ; Student t-test, *** p<0.001). La comparaison des résultats au sein du génotype permet de s'affranchir du fait que les APP/PS1 présentaient un défaut d'apprentissage au dernier jour du test. Cette comparaison, confirme les résultats de la comparaison des génotypes en mettant en évidence un déficit mnésique chez les jeunes femelles APP/PS1 (Figure 3.2 B ; Student t-test, # p<0.05).

Enfin, nous avons réalisé le test du **Hamlet** (voir Partie C.3 pour plus de détail). Ce test est complémentaire au Barnes Maze car il s'affranchit totalement du biais lié au

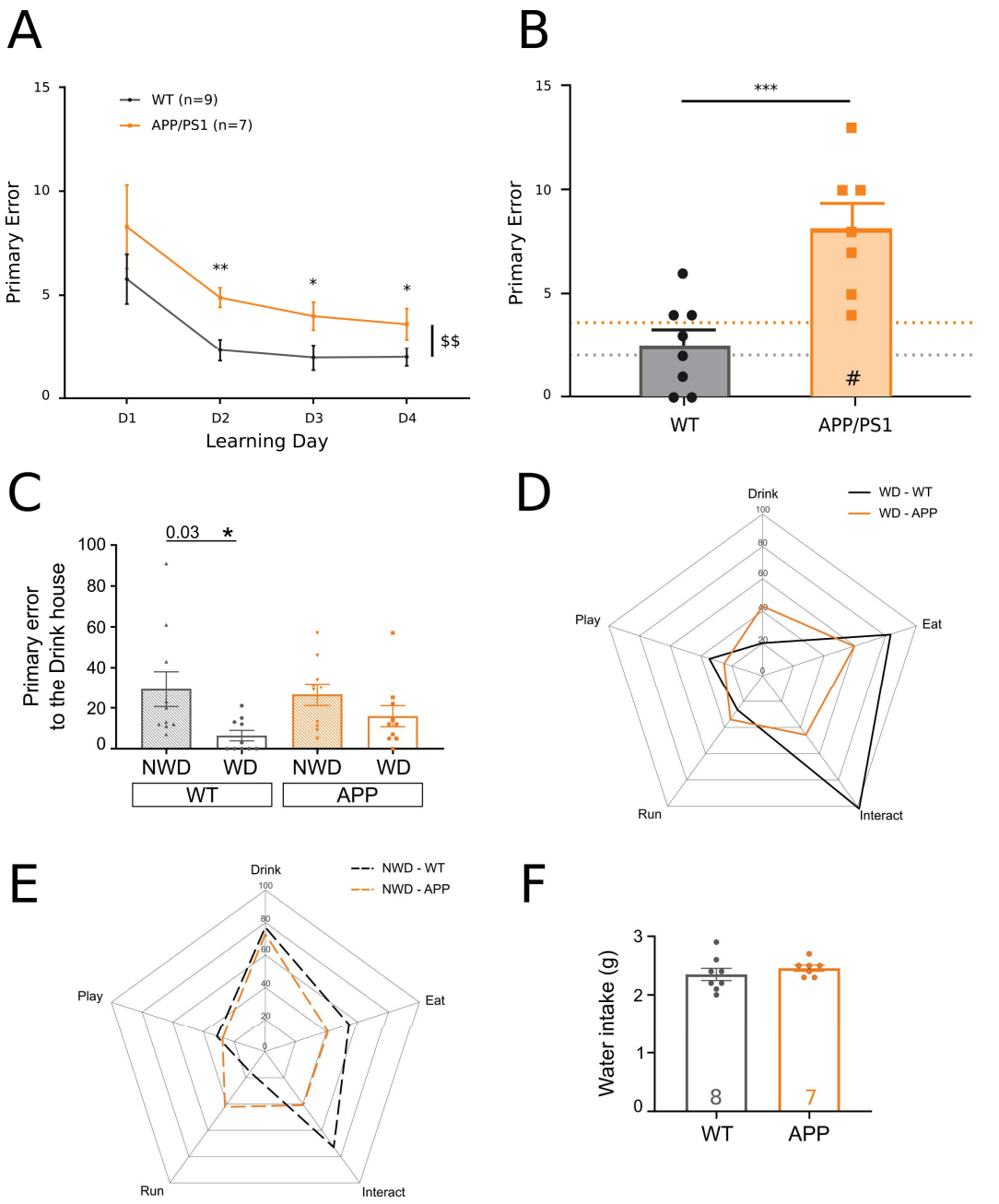


FIGURE 3.2 – **Déficit d'apprentissage et de mémoire chez les souris APP/PS1** Dans le **Barnes maze** à 4 mois : **(A)** Cinétique d'apprentissage des femelles APP/PS1 (Orange, n=7) et WT (Gris, n=9), Moyenne ± SEM. Student t-test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Two-ways ANOVA $$ $p<0.01$. **(B)** Analyse de la rétention à 72h. Moyenne ± SEM. Test entre les génotypes, Student t-test, *** $p<0.001$. Test par rapport à la valeur au dernier jour d'apprentissage, Student t-test # $p<0.05$. Chaque symbole représente un animal.
Dans le **Hamlet** à 2 mois : **(C)** Nombre d'erreurs (Primary error) avant d'atteindre la "maison pour boire", pour les WT (Gris, n=10) et APP/PS1 (Orange, n=10) en condition "assoiffées" (WD, non hachuré) ou non (NWD, hachuré). Moyenne ± SEM, Two-Ways ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, * $p<0.05$. **(D)** Latence moyenne (Primary latency), en condition "assoiffées", avant d'atteindre les différentes maisons. **(E)** Latence moyenne, en condition "non-assoiffées", avant d'atteindre les différentes maisons. **(F)** Mesure (en grammes) de la prise hydrique après 16h d'assoiffement, Moyenne ± SEM.

stress. En effet, dans ce test les souris apprennent avec leurs congénères et sans aucun stimulus anxiogène.

Le test du Hamlet repose sur la sensation de soif et la prise hydrique par les souris. Pour nous assurer de la validité de la comparaison, nous avons donc évalué la prise hydrique des différents génotypes suite à un assoiffement similaire à celui du test. Les résultats obtenus montrent que la prise hydrique consécutive à l'assoiffement est identique chez les souris APP/PS1 et leur contrôles (Figure 3.2 F). Ces résultats sont cohérents avec une étude précédente sur la prise hydrique chez les femelles APP/PS1 [Ramírez-Lugo et al., 2009] et valident le recours au test du Hamlet pour la comparaison de ces deux lignées.

Dans un premier temps, en conformité avec les tests précédents, nous avons testé les souris à 4 mois. Néanmoins, lors de ces tests, l'animalerie était soumise aux travaux de construction du tramway qui ont engendrés de gros problèmes d'apprentissage y compris chez les souris contrôles qui n'ont pas réussi à apprendre la tâche. Nous avons donc décidé de ne pas considérer ces expériences qui, par manque de temps, n'ont pas pu être recommencées.

Pour autant, pour comprendre la cinétique d'installation des déficits cognitifs, j'avais auparavant réalisé les expériences à un âge encore plus précoce (cf. 2 mois), et dans une animalerie calme.

L'analyse de ces résultats montre que les femelles APP/PS1 présentent un déficit mnésique qui est mis en évidence par un plus grand nombre d'erreurs (Figure 3.2 C) et une plus grande latence (Figure 3.2 D) pour atteindre la "maison pour boire" lorsqu'elles sont assoiffées.

De manière intéressante, ce test nous a aussi permis d'analyser d'autres comportements. En effet, lorsqu'elles sont naïves (non assoifées, NWD), les APP/PS1 présentent une latence plus élevée pour aller dans la maison "courir" (Mann-Whitney, * p-value=0.0153). Ce désintérêt pour la roue semble se reporter vers un plus grand intérêt pour interagir avec un nouveau congénère (Figure 3.2 E). Ces résultats semblent indiquer que les stratégies d'exploration basales diffèrent entre ces souris modèles de la MA et leurs contrôles.

Dans l'ensemble, nos résultats révèlent l'existence d'altérations précoces du comportement, en particulier des processus d'apprentissage et de mémorisation, chez les jeunes femelles APP/PS1.

A.2 Amyloïdose et réaction gliale chez les APP/PS1 à 4 mois

Puisque des modifications comportementales apparaissaient dès 4 mois, nous nous sommes employées à caractériser les autres marqueurs de la pathologie. D'un point de vue histologique, nous nous sommes intéressées à deux aspects de la MA : l'amyloïdose et la neuroinflammation.

A.2.i Amyloïde β

Les plaques amyloïdes sont l'une des caractéristiques de la MA. Nous avons étudié la charge amyloïde, d'une part, par marquage histologique des dépôts amyloïdes et d'autre part en utilisant un ELISA ultra sensible permettant de doser les concentrations en peptides amyloïdes, solubles (fraction Triton-soluble) et agrégés (fraction Guanidine-soluble), au cours du développement de la pathologie.

Surproduction d'Aβ à partir de 4 mois chez les APP/PS1

En utilisant la Thiazine Red, un marqueur des feuillets β, nous avons visualisé les plaques amyloïdes denses à différents âges (Figure 3-B de l'Appendice B). Nous avons mesuré la densité en plaques par mm^2 dans le cortex. L'analyse globale à 4 et 8 mois, permet de mettre en évidence l'existence de plaques denses, avec une densité moyenne d'environ 15 plaques/mm^2, à 8 mois mais pas au stade précoce de 4 mois (Figure 3.3 A).

Néanmoins, si ces données à 4 mois sont extraites et traitées indépendamment, l'analyse permet de mettre en évidence que les dépôts amyloïdes denses commencent à se mettre en place dans le cortex des femelles APP/PS1 (Figure 3.3 B). À ce stade, la densité en plaques denses est cependant faible, inférieure à 1 plaque/mm^2.

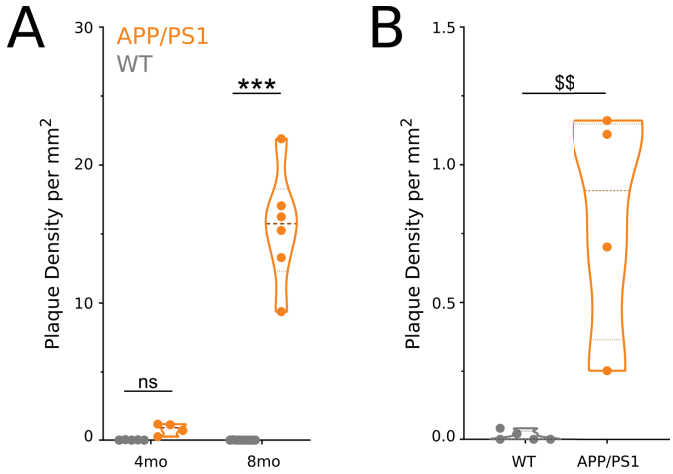


FIGURE 3.3 – **Densité des plaques amyloïdes dans le cortex à 4 mois** - Densité par mm^2 de cortex, du signal specifique Thiazine Red entre les femelles WT (Gris) et APP/PS1 (Orange) à **(A)** 4 et 8 mois ou **(B)** seulement à 4 mois. Two-ways ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, *** p<0.001. Mann-Whitney, $$ p<0.01. Chaque point représente la moyenne de plusieurs champs par animal.

Puisqu'il n'y avait que peu de différence, en histologie, sur la quantification des plaques amyloïdes à 4 mois, nous avons voulu doser ces quantités de manière plus fine en utilisant un ELISA ultra sensible.

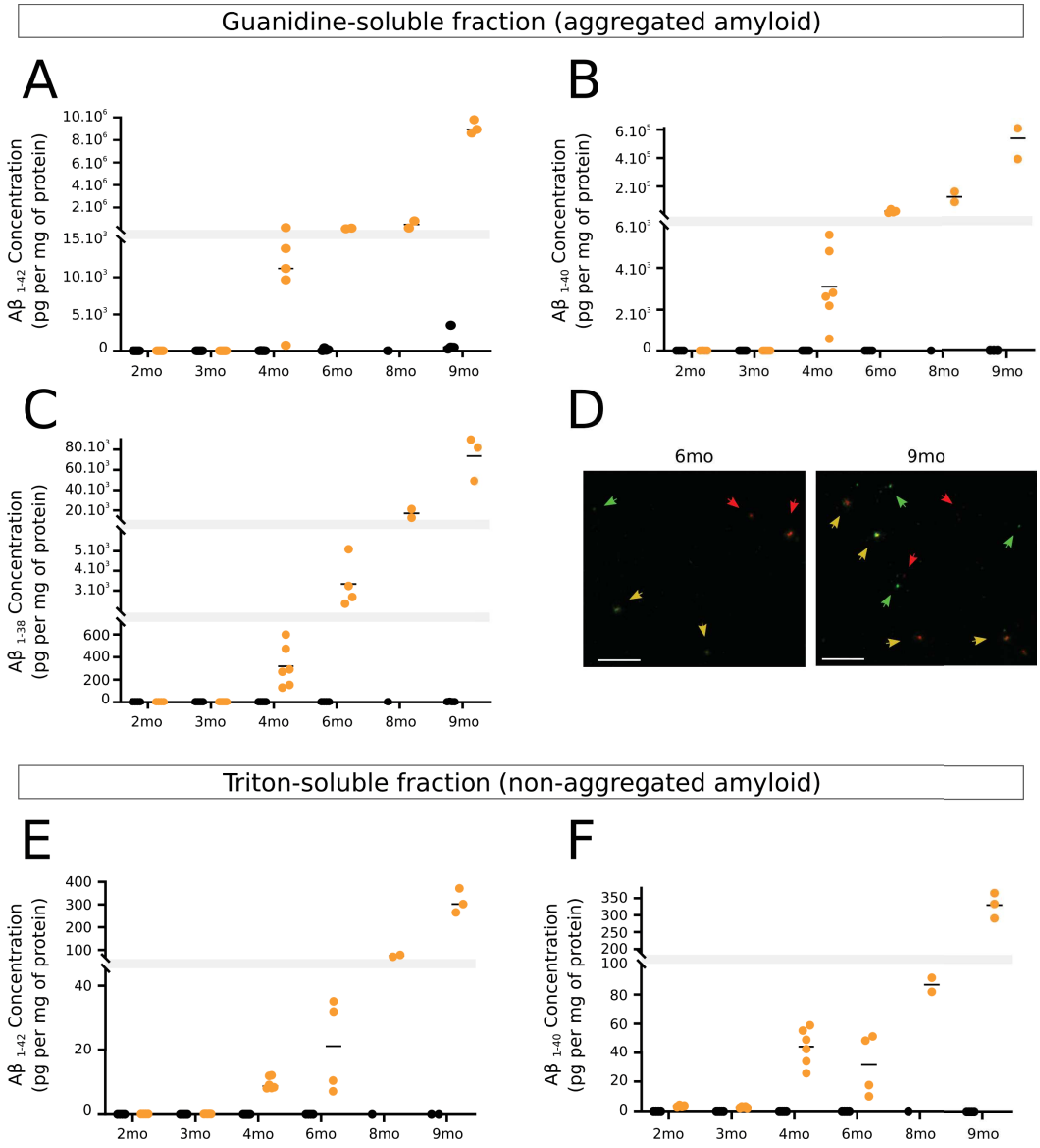


FIGURE 3.4 – **Cinétique d'apparition des espèces d'Aβ dans les fractions triton- et guanidine-solubles** - Dosage par ELISA des concentrations en espèces amyloïdes **(A-E)** Aβ_{1-42}, **(B-F)** Aβ_{1-40}, **(C)** Aβ_{1-38} dans les fractions guanidine-solubles (Haut) et triton-solubles (Bas) chez les animaux WT (Noir, n=2-5) et APP/PS1 (Orange, n=2-6) au cours du temps. Chaque point représente un animal, la barre est placée à la moyenne. **(D)** Immunofluorescence de ThR (Rouge) et 6E10 (Vert) à 6 et 9 mois. Flèches vertes (6E10+), flèches rouges (ThR+), flèches jaunes (6E10+/ThR+). Barre d'échelle 200 μm.

Il est maintenant communément admis que ce ne sont pas les plaques amyloïdes denses qui jouent le rôle le plus néfaste sur le SNC, mais plutôt les oligomères solubles. Nous avons donc dosé les concentrations des peptides A$\boldsymbol{\beta_{1-38}}$, A$\boldsymbol{\beta_{1-40}}$ et A$\boldsymbol{\beta_{1-42}}$ dans les fractions triton-soluble (contenant les amyloïdes solubles) et guanidine-solubles (contenant les amyloïdes agrégés) issues de cortex des animaux à différents âges.

Quelque soient les génotypes ou le type de peptide étudié, à 2 ou à 3 mois, on ne détecte que très peu de signal spécifique, indiquant qu'à ces âges il n'y a pas encore véritablement de sur-production des peptides Aβ.

Dans la fraction guanidine-soluble (amyloïdes agrégés), bien que peu visible avec le marquage Thiazine Red, nous avons pu mesurer une sur-production significative de tous les peptides d'Aβ à partir de 4 mois (Figure 3.4 A-B-C). Cette sur-production augmente progressivement fonction de l'âge et de la mise en place de la pathologie.

Dans la fraction triton-soluble (amyloïdes non agrégés), on observe une sur-production des peptides d'Aβ_{1-42} (Figure 3.4 E) et Aβ_{1-40} (Figure 3.4 F) dès 4 mois. La sur-production dans la fraction triton-soluble de ces deux peptides augmente, elle aussi, en fonction de l'âge et de la mise en place de la pathologie. Remarquablement, l'Aβ_{1-38} n'est détecté à aucun âge (données non montrées).

Dans l'ensemble, nos résultats mettent donc en évidence que, chez les femelles APP/PS1, l'amyloïdose commence à se mettre en place à partir de 4 mois.

Absence de défaut des enzymes de dégradation de l'Aβ

Pour compléter notre étude sur l'amyloïdose au stade précoce, nous avons voulu savoir si l'augmentation de la concentration en Aβ pouvait être due à une diminution de sa dégradation. Nous avons donc quantifié le niveau d'expression des gènes codant pour les **enzymes de dégragation d'A$\boldsymbol{\beta}$** : IDE, MMP9 ou la neprilysin (MME).

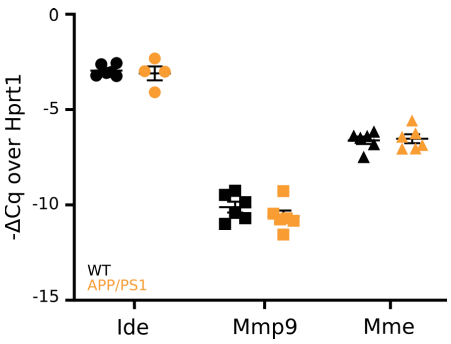


FIGURE 3.5 – **Le niveau d'expression des enzymes de dégradation d'A$\boldsymbol{\beta}$ est inchangé à 4 mois** - Analyse en qPCR du niveau d'expression cortical des gènes d'*Ide*, *Mme* et *Mmp9* chez les femelles APP/PS1 (Orange, n=3-6) et WT (Noires, n=5-6) âgées de 4 mois. Moyenne ± SEM.

L'analyse en qPCR montre que, comparé aux souris contrôles du même âge, le niveau d'expression des gènes *Ide*, *Mme* et *Mmp9* n'est pas modifié chez les femelles APP/PS1 de 4 mois (Figure 3.5).

A.2.ii Une microgliose fine et précoce

Différents facteurs neuroinflammatoires se mettent en place au cours du développement de la pathologie : réaction microgliale et astrocytaire, recrutement de cellules immunitaires périphériques, etc. Parmi ceux-ci la réaction microgliale, ou microgliose, est considérée comme un évènement précoce et initiateur.

Comme nous l'avons vu en introduction, la microgliose se caractérise d'une part, par une hyperplasie et d'autre part, des changements morphologiques. Nous avons donc étudié ces deux paramètres au stade précoce.

La densité microgliale n'est pas impactée dans les stades précoces

La densité microgliale a été quantifiée par deux méthodes : la quantification de la surface marquée avec IBA1 qui prend en compte non seulement le nombre de microglies mais aussi leur morphologie (Figure 3.6 A) et la densité réelle déterminée en comptant le nombre de somas $IBA1^+$ (Figure 3.6 B). Puisqu'il existe une hétérogénéité microgliale spatiale et que la MA se développe de manière région-dépendante, ces analyses ont été effectuées dans deux régions : le cortex et l'hippocampe. Par ailleurs, cette analyse a été réalisée simultanément chez les mâles et les femelles.

Quelque soit la méthode d'analyse, la région ou le sexe, on ne mesure aucun changement de densité microgliale à 4 mois.

Des changements morphologiques complexes dépendants de la région

Puisqu'aucune différence en terme de densité microgliale n'est observée à 4 mois, nous avons cherché à réaliser, à cet âge, une caractérisation de la morphologie des microglies pour étudier des effets plus fins au stade précoce.

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Dr F. Verdonk (Institut Pasteur, Paris). Ce dernier a, en effet, développé une méthodologie permettant l'analyse automatique et simultanée de nombreux paramètres morphologiques sur un grand nombre de microglies [Verdonk et al., 2016]. Ces paramètres permettent d'apprécier la morphologie microgliale dans son ensemble. Cette technique permet donc une analyse statistiquement robuste et très fine des cellules. Pour augmenter, le nombre de microglies analysées et accroître la puissance statistique des analyses, ces dernières ont été réalisées chez souris APP/PS1.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$ [Verdonk et al., 2016], et pour limiter les facteurs de variabilité, elles ont été réalisées chez des mâles uniquement.

Dans un premier temps, l'analyse réalisée par le Dr Verdonk a permis de confirmer nos propres données quant à l'absence d'hyperplasie microgliale chez les souris modèles de la MA (données non montrées).

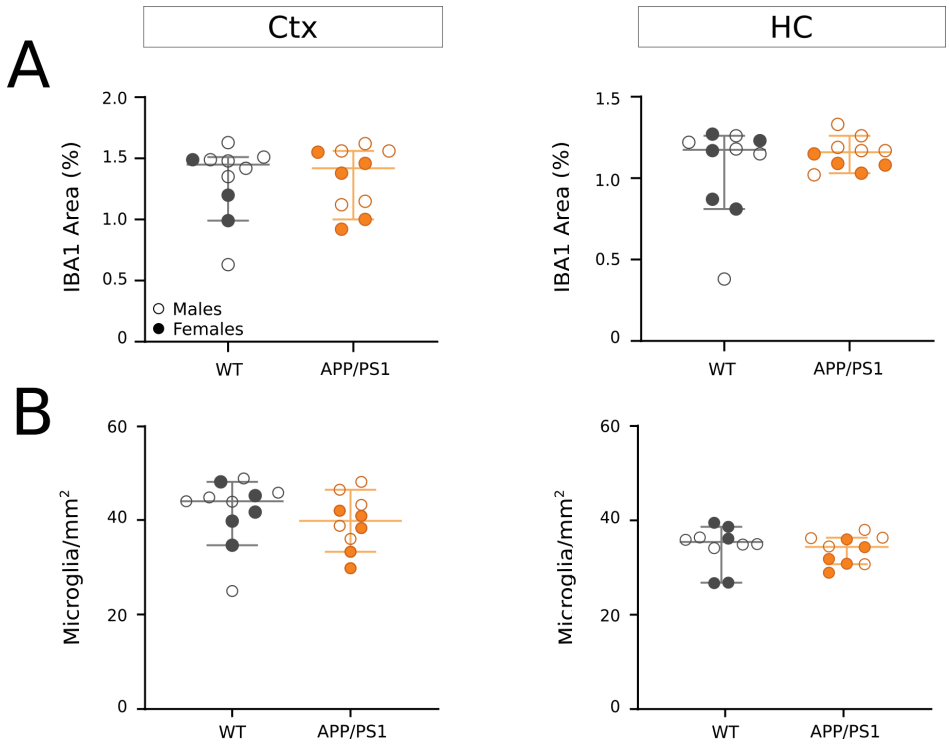


FIGURE 3.6 – **Absence d'hyperplasie microgliale à 4 mois - (A)** Aire couverte par le marquage IBA1 en pourcentage de l'aire totale dans le cortex (Ctx) ou l'hippocampe (HC). Aucun effet du génotype ou du sexe n'est observé. **(B)** Analyse de la densité microgliale par mm^2 de cortex ou d'hippocampe. Aucun effet du génotype ou du sexe n'est observé. Chaque point représente un animal. Médiane ± quartiles. Aucune différence entre les APP/PS1 (Orange, n=7) et les WT (Gris, n=7) n'est observée.

Dans un second temps, il a procédé à l'analyse morphologique. Pour chacune des conditions entre 3000 et 4000 microglies, soit 200 cellules par souris, ont été analysées. Différents paramètres ont été mesurés : (i) le territoire cérébral couvert par une microglie (CEA), (ii) la complexité microgliale, c'est à dire le nombre de ses ramifications et prolongements primaires, (iii) la taille du cytoplasme comprenant le corps cellulaire et les prolongements primaires, et enfin (iv) la taille du corps cellulaire.

Les résultats révèlent que, les microglies des souris APP/PS1.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$, dans le cortex, présentent des corps cellulaires plus gros (Figure 3.7 C-D) sans modification de la complexité de leurs prolongements (Figure 3.7 B). À l'opposé, dans l'hippocampe, la taille des corps cellulaires n'est pas modifiée mais la complexité des prolongements est diminuée (Figure 3.7 B). Quelque soit la structure, ces modifications morphologiques fines n'induisent pas de modification de l'aire couverte par la microglie (Figure 3.7 A).

Les changements morphologiques observés à 4 mois sont donc assez fins et dépendent de la région. Ces modifications morphologiques suggèrent que, dès 4 mois, les microglies tendent vers un phénotype plus réactif.

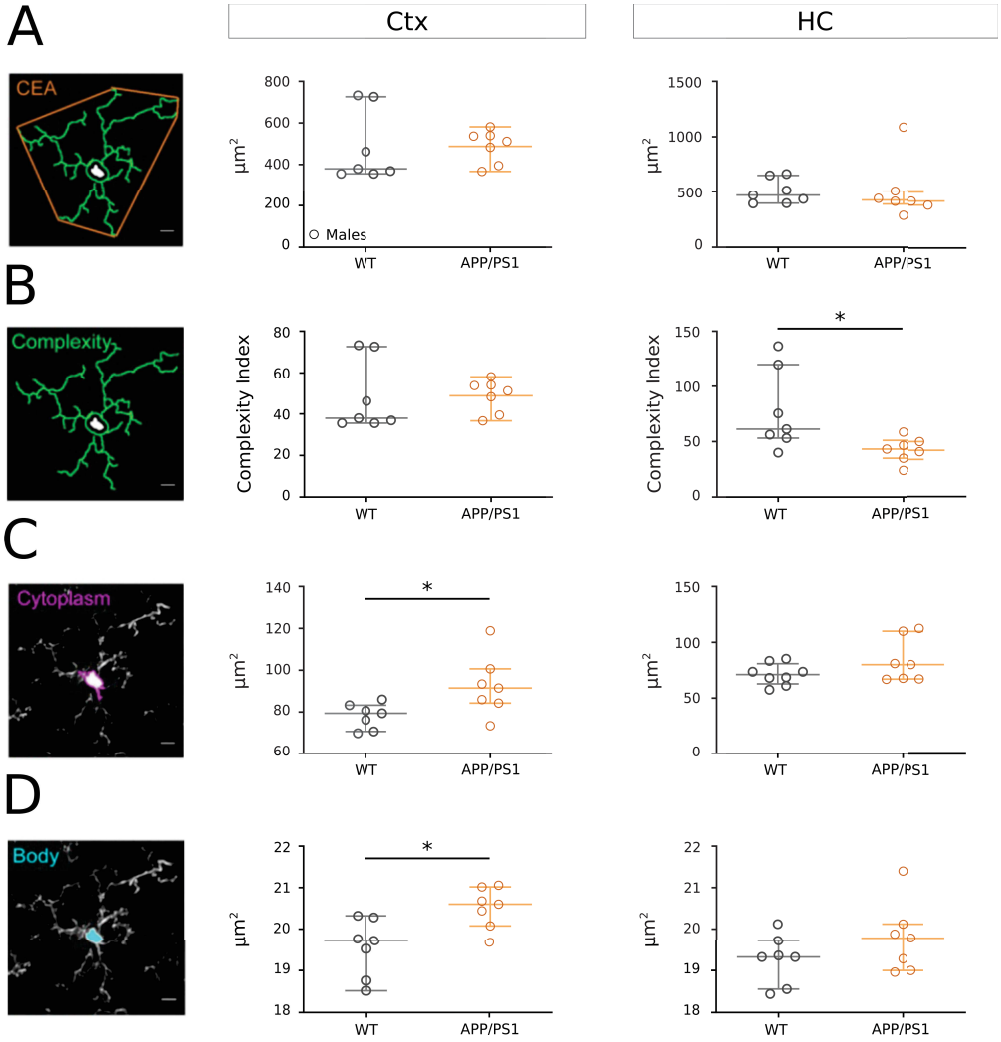


FIGURE 3.7 – **À 4 mois, les modifications morphologiques sont subtiles et dépendantes de la région cérébrale** - Représentations tirées de la publication originale indiquant les paramètres mesurés dans l'analyse automatique [Verdonk et al., 2016]. Les quantifications ont été réalisées dans dans le cortex (Ctx) ou l'hippocampe (HC) **(A)** Aire couverte par la microglie en μm^2. **(B)** Complexité de l'arborisation microgliale dans le cortex ou l'hippocampe ; l'index est calculé en divisant le nombre total de segments par le nombre de ramifications primaires. **(C)** Aire cytoplasmique en μm^2. **(D)** Aire du corps cellulaire en μm^2. Des différences fines qui dépendent de la structure sont observées entre les APP/PS1 (Orange, n=7) et les WT (Noir, n=7). Chaque point représente un animal, médiane ± quartiles. Mann-Whitney, * $p<0.05$.

A.2.iii Absence de réactivité astrocytaire

Dans les stades tardifs de la MA, la neuroinflammation se caractérise aussi par une réactivité astrocytaire. En conditions physiologiques, les astrocytes corticaux n'expriment pas ou peu la GFAP au contraire, lorsqu'ils sont réactifs l'expression de cette protéine est fortement augmentée [Ben Haim et al., 2015; Escartin et al., 2021]. Le niveau d'expression de la GFAP représente donc, dans cette structure, un marqueur pertinent de la réaction astrocytaire.

Quelque soit le sexe, dans le cortex, à 4 mois, nous n'avons observé aucune différence en termes de réaction astrocytaire entre les souris APP/PS1 et les contrôles (Figure 3.8).

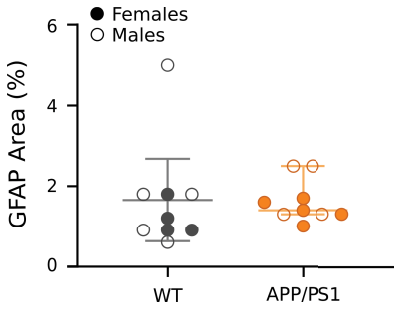


FIGURE 3.8 – **Absence de réaction astrogliale à 4 mois** - Aucun effet du génotype ou du sexe sur le niveau d'expression de la GFAP n'est observé. APP/PS1 (Orange), WT (Gris), mâles (ronds vides), femelles (ronds pleins). Chaque point représente un animal, Médiane ± quartiles.

A.2.iv Un état neuroinflammatoire intact

Enfin, pour quantifier l'inflammation de manière plus globale, nous avons étudié différents gènes liés à la réaction inflammatoire chez les femelles à 4 mois.

Nos résultats montrent, qu'à ce stade précoce, l'état inflammatoire du tissu cortical n'est globalement pas affecté. En effet, parmi les gènes analysés, seul l'ARNm de *Cxcl10* est augmenté chez les femelles APP/PS1 à 4 mois (Table 3.1).

A.3 Une désorganisation synaptique complexe

Des modifications synaptiques ont été observées au cours du développement de la MA [De Wilde et al., 2016]. Au stade tardif, la neurodégénérescence entraîne une perte synaptique induisant donc une diminution des marqueurs synaptiques. Dans notre contexte du stade précoce, supposant que la perte synaptique était certainement faible à ce stade, nous n'avons pas voulu étudier la perte mais plutôt la désorganisation au sein de la synapse. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la composition des synaptosomes préparés à partir de cortex de femelles de 4 mois. Nous avons quantifié, par Western-Blot, à la fois

Gene	WT (Mean ± SEM)	APP/PS1 (Mean ± SEM)	Significativité
Gènes homéostatiques			
Hexb	-6,210 ± 0,108	-6,660 ± 0,213	ns
P2y12	-4,407 ± 0,1661	-4,298 ± 0,158	ns
Cytokines et chémokines			
Ccl2	-13,26 ± 0,506	-12,10 ± 0,219	ns
Ccl12	-6,608 ± 0,137	-6,918 ± 0,552	ns
Cxcl10	-9,574 ± 0,229	-7,810 ± 0,323	**
Il1b	-9,778 ± 0,238	-9,893 ± 0,150	ns
Tgfb	-5,745 ± 0,117	-5,945 ± 0,133	ns
Marqueurs des microglies réactives			
Cd68	-4,247 ± 0,075	-4,292 ± 0,113	ns
Cd72	-10,26 ± 0,308	-10,16 ± 0,247	ns
Cd86	-6,390 ± 0,057	-6,350 ± 0,095	ns
Ctsd	-2,853 ± 0,069	-2,717 ± 0,108	ns
Myd88	-7,993 ± 0,178	-8,230 ± 0,194	ns
Tyrobp	-2,853 ± 0,070	-2,717 ± 0,108	ns
Gènes des DAMs			
Apoe	1,380 ± 0,181	1,315 ± 0,136	ns
Trem2	-5,987 ± 0,170	-5,857 ± 0,1336	ns

TABLE 3.1 – **Faible impact de la pathologie amyloïde sur l'état inflammatoire du tissu cortical chez les femelles APP/PS1 à 4 mois** - Table récapitulative des niveaux d'expressions (exprimés en -ΔCq) d'un panel de gènes neuroinflammatoires chez les WT et les APP/PS1. Mann-Whitney, ** $p<0.01$.

des marqueurs pré- (Synaptophysine) et post-synaptiques (PSD95, Homer1 et NR1a [la sous-unité obligatoire du récepteur NMDA] [Atlason et al., 2007]).

Chez les souris APP/PS1, nous observons une diminution de la quantité de synaptophysine (Figure 3.9 A) et de PSD95 (Figure 3.9 B). Nos résultats indiquent aussi, chez ces souris, une tendance à la diminution de l'expression NR1a (Figure 3.9 C), tandis que celle de la protéine d'échafaudage Homer est inchangée (Figure 3.9 D).

Ces résultats suggèrent donc un début de désorganisation des deux éléments synaptiques chez les femelles APP/PS1 de 4 mois.

A.4 4 mois, un âge charnière chez les femelles APP/PS1

En conclusion, chez les femelles APP/PS1 nous avons pu mettre en évidence un ensemble de déficits fins se mettant en place dès 4 mois (Figure 3.10).

D'un point de vue comportemental, ces souris présentent une hyperlocomotion ainsi qu'un apprentissage moins efficace qui est associé à un défaut de mémorisation. Ces défauts comportementaux concordent avec une désorganisation des éléments pré- et post-synaptiques.

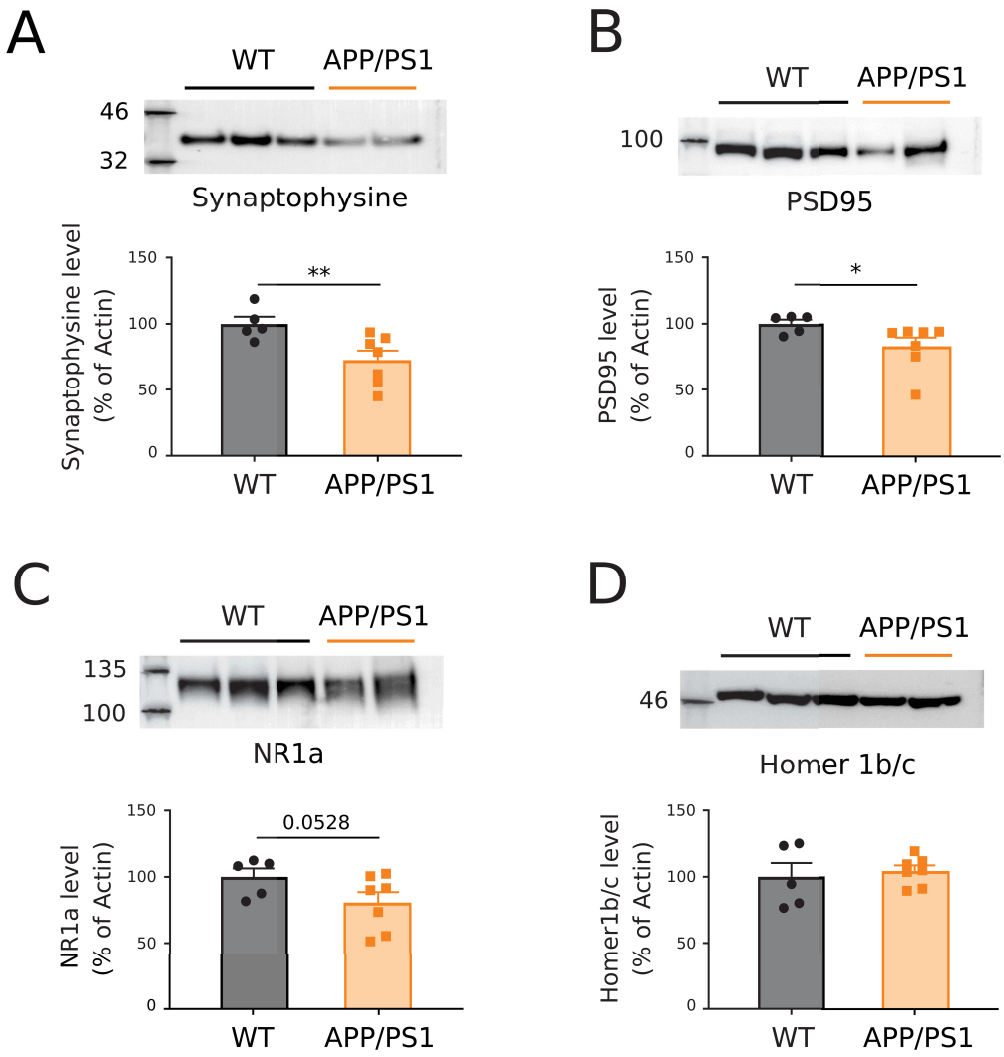


FIGURE 3.9 – **Désorganisation synaptique dès 4 mois chez les APP/PS1** - La fraction synaptosomale a été caractérisée par Western Blot. Par rapport aux contrôles (Gris), les niveaux d'expression en synaptophysine **(A)** et en PSD95 **(B)** sont diminués chez les femelles APP/PS1 (Orange) à 4 mois. Le niveau d'expression de NR1a **(C)** tend aussi à diminuer tandis que celui de Homer1b/c **(D)** reste stable. Moyenne ± SEM. Student t-test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

De plus, nous avons démontré que l'âge de 4 mois représente le point de départ de l'hyper-production de différentes espèces d'amyloïde-β que ce soit sous leurs formes solubles ou agrégées.

Enfin, nos résultats suggèrent que l'état inflammatoire est, à ce stade, légèrement altéré. Ces altérations reposent sur des modifications microgliales plutôt qu'astrocytaires, et sont par ailleurs assez fines.

Les changements morphologiques et transcriptomiques fins mais néanmoins significatifs de la microglie qui ont été observées, confirment que ces cellules représentent des cibles précoces dans la MA et que 4 mois représente, chez les APP/PS1, un âge charnière pour les étudier.

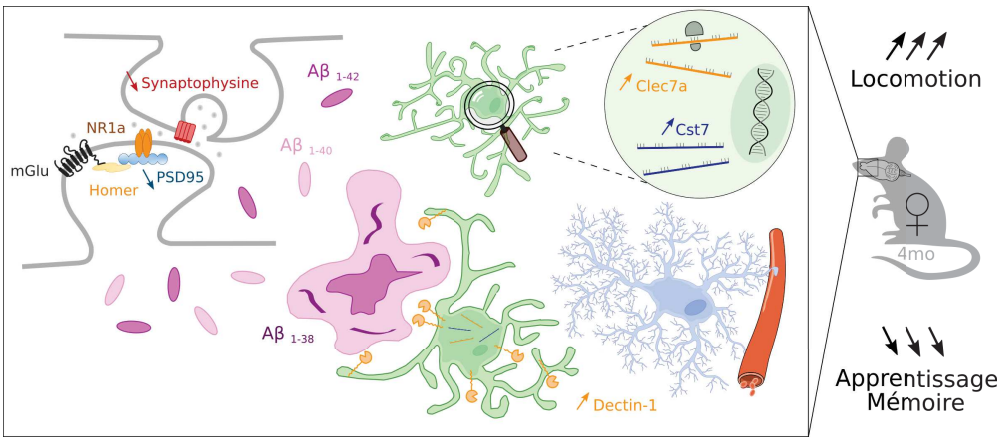


FIGURE 3.10 – **Schématisation bilan des défauts déjà présents à 4 mois chez les femelles APP/PS1** - Microglie en vert, Astrocyte en bleu, vaisseau sanguin en rouge. Sur-production des espèces d'amyloïde soluble (Roses) et début d'agrégation des trois sous-espèces sous forme d'oligomères et de plaque (Pourpres).

B *Cst7* et *Clec7a*/Dectin-1 au stade précoce : où, quand et pourquoi ?

En parallèle de la caractérisation du modèle APP/PS1 à 4 mois, nous avons étudié, principalement dans ce modèle de la MA mais aussi dans d'autres, l'expression de nos cibles d'intérêts, *Cst7* et *Clec7a*/Dectin-1, identifiées dans l'analyse transcriptomique (voir Introduction D.3).

B.1 La sur-expression des cibles apparaît dès 4 mois et reflète la progression de la MA

En premier lieu, la cinétique d'expression des cibles a été caractérisée dans le cortex de souris APP/PS1 d'âges compris entre 2 et 20 mois (Figure 3.11). Bien que les valeurs

d'expression ne puissent pas être directement comparées (cf. elles n'ont pas été mesurées dans les mêmes expériences), nos résultats indiquent que l'expression des cibles augmente de manière significative au cours du vieillissement physiologique (Figure 3.11 et données non-montrées), confirmant ainsi les données de la littérature [Hickman et al., 2013].

Néanmoins, l'augmentation de l'expression de ces gènes est accélérée dans la MA. Ainsi, dès 4 mois, on observe une sur-expression de *Clec7a* (Figure 3.11 A) et de *Cst7* (Figure 3.11 B) chez les souris APP/PS1 comparé aux souris contrôles du même âge. Cette sur-expression est conservée et s'accroît avec le décours de la pathologie, atteignant un plateau aux alentours de 15 mois, un âge où les symptômes de la pathologie sont extrêmement marqués.

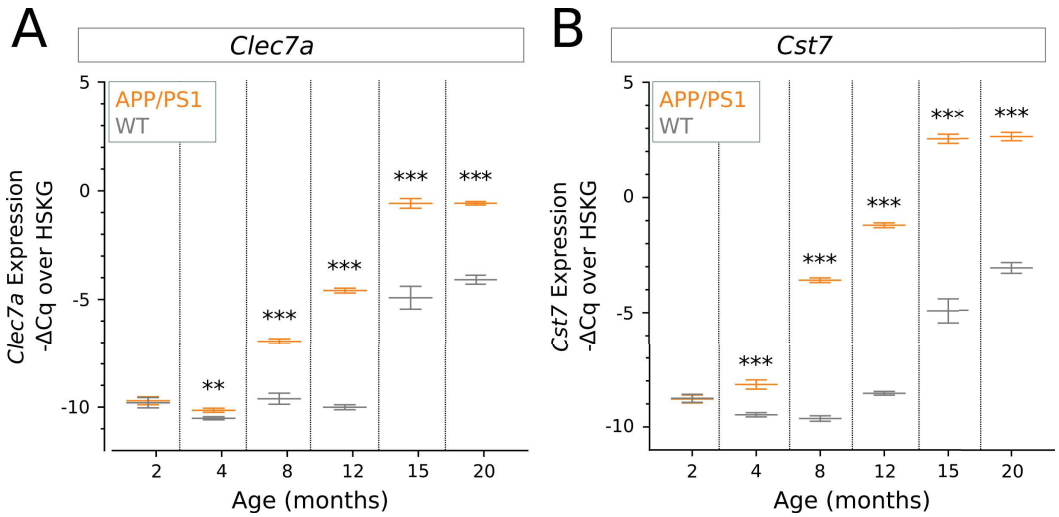


FIGURE 3.11 – **Pseudo-cinétique d'expression de *Clec7a* et *Cst7* dans le modèle APP/PS1** - Expression relative de *Clec7a* **(A)** et *Cst7* **(B)** durant le vieillissement physiologique chez les WT (Gris, n=3-17) et le développement de la MA chez les APP/PS1 (Orange, n=6-18). Les valeurs d'expression sont exprimées en -ΔCq par normalisation avec le niveau d'expression des gènes de ménage (HSKG). Moyenne ± SEM. Student t-test par âge, ** p<0.01, *** p<0.001. *NB : Les niveaux d'expression n'ayant pas tous été mesurés dans les mêmes expériences, les différences inter-âges ne peuvent pas être directement comparées.*

B.2 Des cibles communes à divers modèles murins de la MA

Afin de renforcer l'intérêt de ces cibles, nous avons cherché à démontrer leur implication dans divers modèles animaux de la MA.

Grâce au Dr S. Claeysen (IGF, Montpellier), nous avons pu obtenir des souris mâles **5xFAD** âgées de 1.5 et 4 mois. Chez ces animaux, nous avons analysé l'expression de *Cst7* et *Clec7a* dans le cortex. Dans ce modèle les symptômes de la MA se mettent en

place dès 2 mois (Figure 2.2) et d'abord dans le cortex. Comme chez les APP/PS1, le niveau d'expression des deux cibles augmentent avec le décours de la pathologie (Figure 3.12 A-B). De manière intéressante, avec le vieillissement physiologique, on note une augmentation modérée mais très significative de l'expression de *Cst7* (Figure 3.12 B) mais pas *Clec7a*.

Grâce au Dr C. Desrumaux (MNDN, Montpellier), nous avons pu obtenir des ARNm de souris mâles/femelles **J20** âgées de 3, 6 ou 9 mois. Chez les souris J20, la pathologie débute dans l'hippocampe, l'expression des cibles a donc été analysée dans cette région. L'analyse des données brutes ne révèle aucune ségrégation en fonction du sexe laissant penser que, dans ce modèle, ce facteur a un impact négligeable, et justifiant ainsi une analyse indépendamment du sexe.

Les souris J20 sont élevées sous le même fond génétique (cf. C57BL6/J) que les 5xFAD et les APP/PS1. Dans ce contexte, on aurait peu s'attendre à une augmentation de l'expression des cibles au cours du vieillissement physiologique. Ce n'est pas ce que nous observons, néanmoins ce résultat pourrait en partie s'expliquer par la plus faible puissance statistique de ces expériences compte-tenu de nombre de conditions expérimentales et du nombre de réplicas biologiques dans chacune de ces conditions.

Chez les souris J20, au stade très précoce de 3 mois, aucune variation de l'expression des cibles n'est mesurée. Néanmoins, à partir de 6 mois, lorsque les plaques et la gliose apparaissent, on observe que l'expression de *Cst7* tend à augmenter (Figure 3.12 D). Enfin, au stade tardif de 9 mois, les expressions de *Clec7a* (Figure 3.12 C) et de *Cst7* (Figure 3.12 D) sont augmentées de façon significatives.

Enfin, nous avons aussi choisi d'analyser ces cibles dans un modèle plus physiopathologique de la MA, le modèle $\mathbf{APP}^{\boldsymbol{NL-F}}$. Pour l'instant nous n'avons pu analyser qu'un seul âge, 9 mois. Selon la littérature, cet âge correspond à un stade intermédiaire de développement de la MA, c'est à dire que les animaux ont développé une amyloïdose associée à une réaction microgliale (Voir partie B.5.i). Le sexe n'étant pas un facteur de variabilité (Two-ways ANOVA, p-value>0.8), nous avons rassemblé les deux sexes pour l'analyse statistique. À cet âge, nous observons une augmentation à la fois de *Clec7a* (Figure 3.12 E) et de *Cst7* (Figure 3.12 F) dans le cortex des homozygotes.

De manière intéressante on note qu'à cet âge et pour les deux gènes, la différence d'expression entre les WT et les homozygotes est similaire à celle observé chez les APP/PS1 de 6 mois (les valeurs de -$\Delta\Delta$Cq sont similaires). Comme attendu, ceci reflète un développement plus lent de la pathologie chez les homozygotes APP^{NL-F} que que chez les héterozygotes APP/PS1. Néanmoins, à cet âge, l'augmentation d'expression des cibles est déjà forte suggérant que ces animaux pourraient être étudiés à un âge plus précoce.

Dans le cas des formes familiales de la MA, les patients porteurs des mutations ne présentent qu'un allèle muté. Nous avons donc aussi étudié les niveaux d'expression de nos cibles chez les hétérozygotes. À 9 mois, nous n'observons aucune différence dans l'expression de *Cst7* et *Clec7a* entre les souris hétérozygotes et les souris contrôles (Figure 3.12 E-F, Vert clair). Ceci suggère un développement plus lent de la pathologie chez les hétérozygotes APP^{NL-F}.

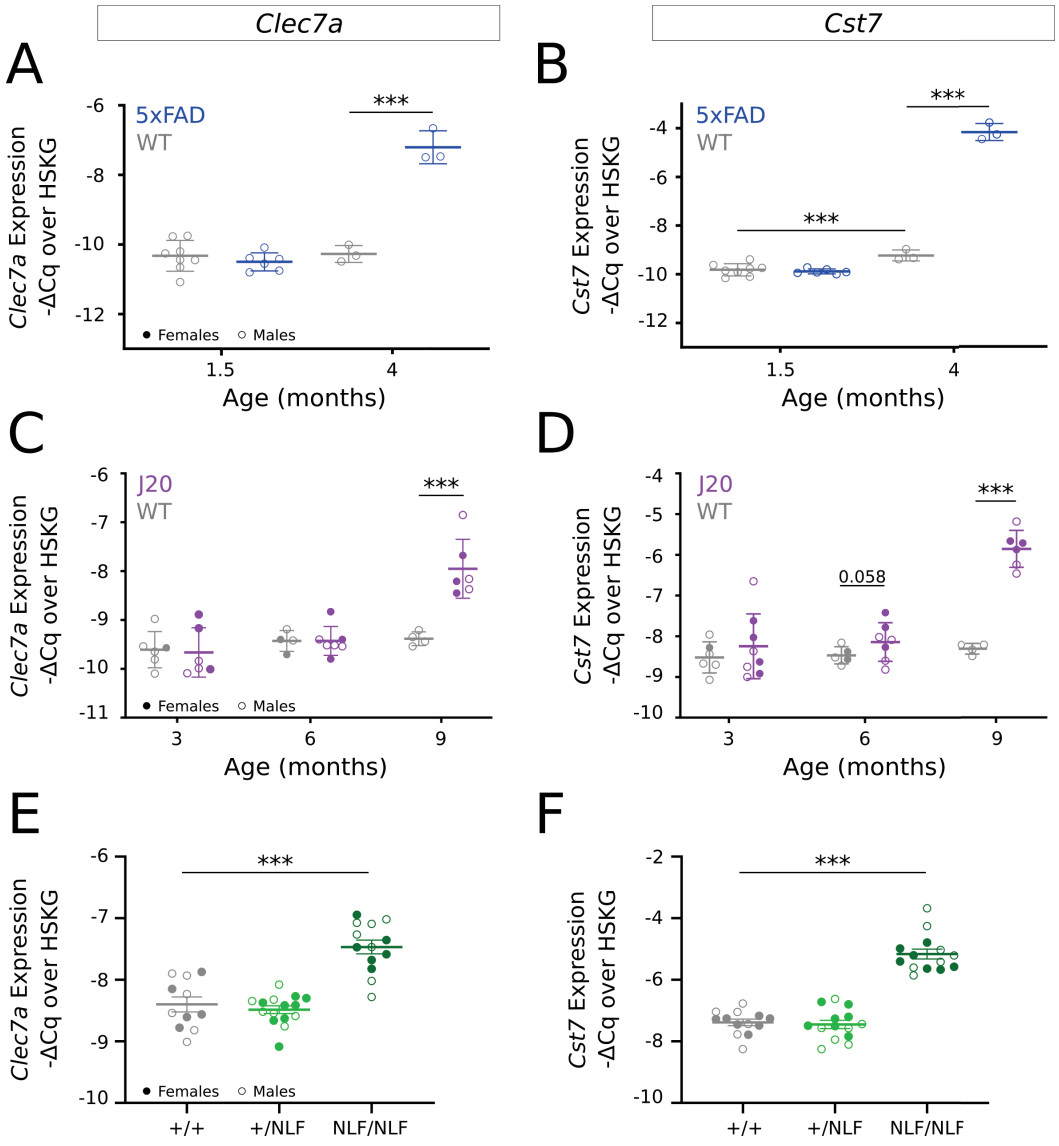


FIGURE 3.12 – **Cinétique d'expression de *Clec7a* et *Cst7* dans différents modèles murins de la MA** - Expression relative de *Clec7a* **(A-C-E)** et *Cst7* **(B-D-F)** dans les différentes conditions expérimentales. Évolution de l'expression au cours du temps dans le modèle 5xFAD (**A-B**, cortex) chez les WT (Gris) et les transgéniques (Bleu marine). Évolution de l'expression au cours du temps dans le modèle J20 (**C-D**, hippocampe) chez les WT (Gris) et les transgéniques (Violet). Étude du niveau d'expression dans le modèle APP^{NL-F} à 9 mois (**E-F**, cortex), chez les WT (Gris), les hétéozygotes (Vert clair) et les homozygotes (Vert foncé). Chaque symbole représente un animal. Moyenne ± SEM. Two-ways ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, *** p<0.001. *Dans les modèles où des mâles (ronds vides) et des femelles (ronds pleins) ont été utilisés, on ne note aucun effet du sexe.*

En conclusion, dans cette série d'expérience, nous avons démontré que *Cst7* et *Clec7a* sont des cibles évoluant avec les décours de la MA non seulement chez les APP/PS1 mais aussi chez les 5xFAD, les J20 et les APP^{NL-F}.

La variation d'expression de *Cst7* semble plus sensible que celle de *Clec7a*. En effet, l'augmentation du niveau d'expression de *Cst7* est toujours plus forte et souvent plus précoce.

B.3 La sur-expression microgliale dépend de la localisation

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus précisément la localisation spatiale des deux cibles, notamment en regard des dépôts amyloïdes.

Comme au stade tardif, nous avons utilisé la technique du RNAScope pour visualiser et quantifier l'expression des ARNms des deux cibles dans le cortex (voir Introduction section D.2). Néanmoins, cette fois-ci, nous avons choisi de marquer l'Aβ avec l'anticorps 6E10 qui permet de visualiser des dépôts diffus qui apparaissent avant les plaques denses. Pour faciliter la détection des cellules microgliales, ces expériences ont été réalisées chez des souris APP/PS1.$CX_3CR_1^{+/eGFP}$.

B.3.i L'expression de *Cst7* est induite à proximité des dépôts amyloïdes mais pas seulement

Nos résultats ont d'abord permis de valider que l'expression de *Cst7* est bien restreinte aux cellules $CX_3CR_1^{+/eGFP}$, identifiées comme des microglies.

La figure 3.13 révèle une sur-expression de *Cst7* dans des microglies associées à du marquage amyloïde (Figure 3.13 A). Ces microglies associées aux dépôts d'Aβ semblent répondre de manière individuelles en exprimant *Cst7* à différents niveaux. En effet, alors que certaines expriment de forts niveaux d'ARNm, rendant impossible la visualisation des molécules unitaires (Figure 3.13 A, flèche bleue marine), d'autres présentent une expression plus faible (Figure 3.13 A, flèche jaune/orange). Certaines sont même dépourvues de tout marquage (Figure 3.13 A, flèche grise). De manière intéressante cette sur-expression de *Cst7* ne semble pas corréler avec la taille des dépôts amyloïdes (Figure 3.13 B).

Par ailleurs, notre analyse met aussi en évidence une sur-expression de *Cst7* dans certaines microglies non-associées aux dépôts amyloïdes et de forme homéostatique (Figure 3.13 C).

Pour quantifier la sur-expression de *Cst7* chez les souris APP/PS1, nous avons calculé, pour chaque champ analysé le H-Score, un indice qui intègre le niveau d'expression de *Cst7* dans chacune des microglies du champ (voir Matériels et méthodes section D.7). Cette quantification met en évidence que, les microglies associées aux dépôts expriment des niveaux de *Cst7* plus importants que les microglies contrôles ou les microglies non-associées aux dépôts. De manière intéressante, cette quantification confirme aussi que globalement les microglies non-associées aux plaques sur-expriment bien *Cst7* (Figure 3.13 D). La différence d'expression mesurée est bien due à une augmentation du niveau

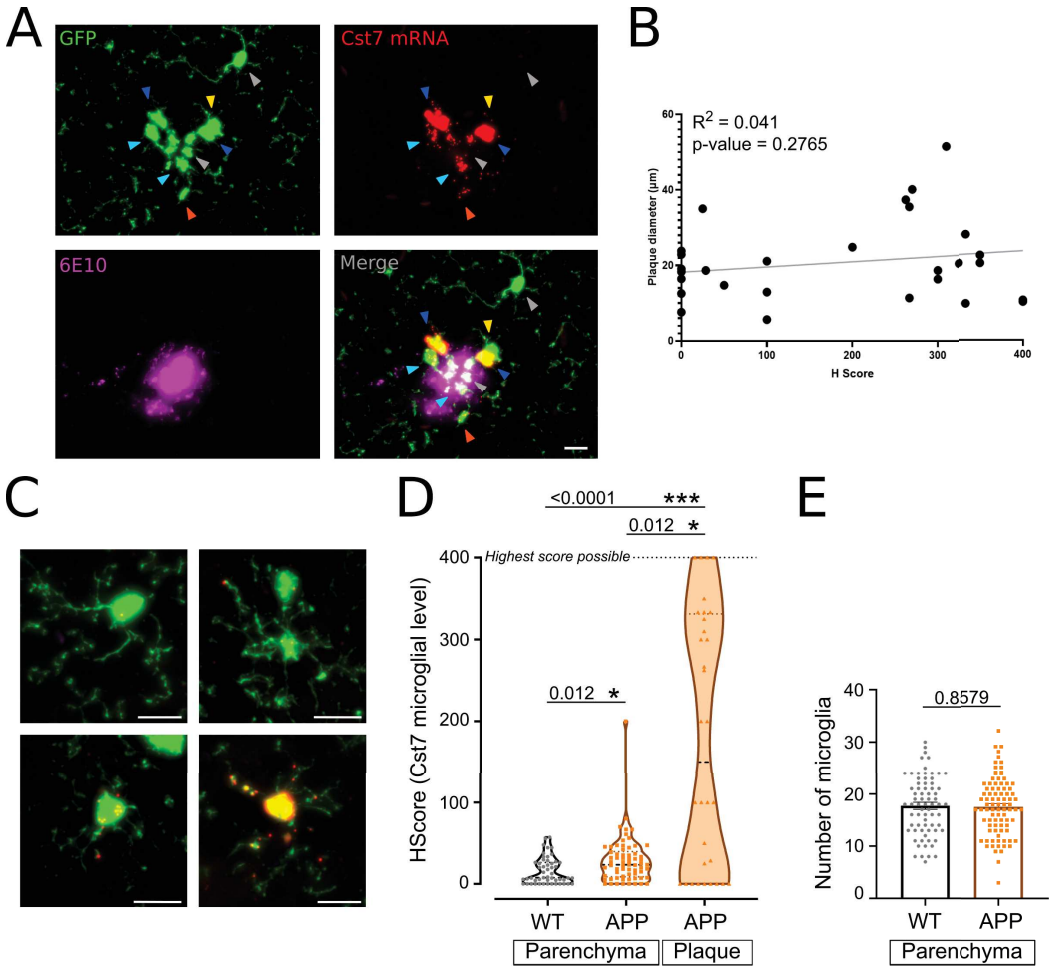


FIGURE 3.13 – **Surexpression de *Cst7* au stade précoce - (A)** Image d'un dépôt amyloïde à 4 mois montrant des microglies exprimant des niveaux différents de *Cst7* (Score). Flèche grise, microglie négative. Flèche jaune, microglie score 1. Flèche orange, microglie score 2. Flèche turquoise, microglie score 3. Flèche bleu marine, microglie score 4. Barre d'échelle : 15 μm. **(B)** Corrélation de Pearson entre la taille des dépôts amyloïdes et le H-Score dans les champs associés à ces dépôts. **(C)** Microglies du parenchyme présentant différents scores d'expression pour *Cst7*. Les images sont des superpositions de 3 marquages : GFP pour la microglie, RFP pour *Cst7* et rouge lointain pour l'Aβ (6E10). Barre d'échelle : 15 μm. **(D)** Représentation en diagramme en violon de la quantification des scores dans les microglies (H-Score) représentant, par champ, le niveau d'expression moyen de *Cst7* chez les souris WT (Gris, n=4) et les souris APP/PS1 (Orange, n=5). Kruskal-Wallis, * p<0.05, *** p<0.001. **(E)** Nombre de microglies analysées par champ pour les champs dépourvus de dépôt amyloide. Moyenne ± SEM.

d'expression de *Cst7* dans les microglies puisque nous avons analysé le même nombre de microglies chez les animaux WT et APP/PS1 (Figure 3.13 E).

Nos résultats confirment donc la surexpression de *Cst7* au stade précoce et montrent qu'il existe une hétérogénéité microgliale de cette expression. Cette hétérogénéité est plus forte pour les microglies associées aux dépôts mais existe aussi dans le reste du parenchyme indépendamment des dépôts d'Aβ.

B.3.ii L'expression de *Clec7a* semble dépendante des plaques

Nous avons utilisé la même méthode pour l'analyse de l'expression de *Clec7a*. Comme décrit dans la littérature pour les stades tardifs [Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017], nos résultats montrent que, dès les stades précoces, les microglies associées aux dépôts amyloïdes sont positives pour *Clec7a* (Figure 3.14 A). Comme pour *Cst7*, cette sur-expression autour des dépôts n'est pas corrélée à la taille de ces derniers (Résultats non montrés).

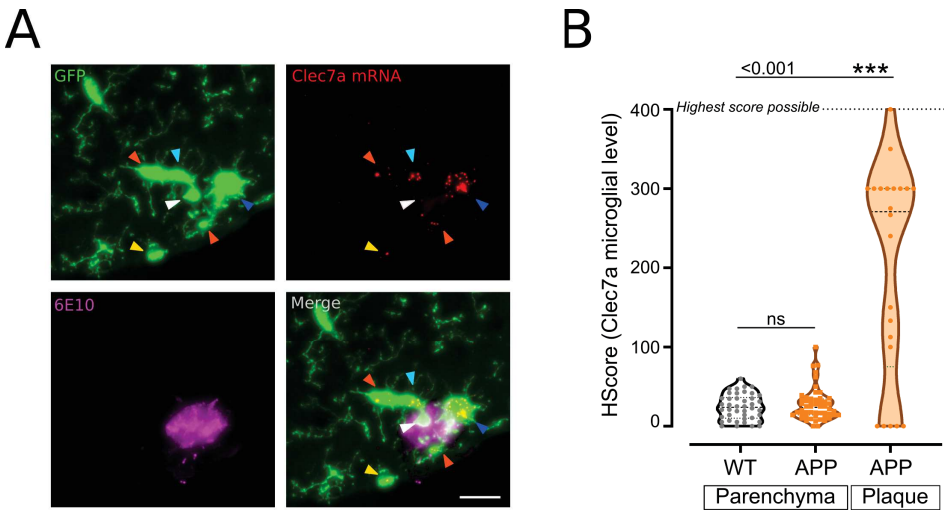


FIGURE 3.14 – **Surexpression de *Clec7a* au stade précoce - (A)** Image d'un dépôt amyloïde à 4 mois montrant des microglies exprimant des niveaux différents d'ARNm (Score). Flèche blanche, microglie négative. Flèche jaune, microglie score 1. Flèche orange, microglie score 2. Flèche turquoise, microglie score 3. Flèche bleu marine, microglie score 4. Les images sont des superposition de 3 marquages : GFP pour la microglie, RFP pour *Clec7a* et le rouge lointain pour l'Aβ (6E10). Barre d'échelle : 20 μm. **(B)** Représentation en diagramme en violon de la quantification des scores des microglies (H-Score) représentant, par champ, le niveau d'expression moyen de *Clec7a* chez les souris WT (Gris, n=3) et les souris APP/PS1 (Orange, n=4). Kruskal-Wallis, *** $p<0.001$.

La figure 3.14 révèle aussi une hétérogénéité microgliale de la sur-expression de *Clec7a* autour du marquage amyloïde. Comme pour *Cst7*, les microglies associées aux plaques semblent répondre de manière individuelles en exprimant le gène à différents

niveaux : certaines microglies expriment de forts niveaux d'ARNm (Figure 3.14 A, flèche bleue marine), d'autres présentent une expression plus faible (Figure 3.14 A, flèche jaune/orange), et certaines sont même dépourvues de tout marquage (Figure 3.14 A, flèche blanche).

La quantification du marquage confirme la sur-expression de *Clec7a* dans les microglies associées aux dépôts amyloïdes (Figure 3.14 B). Néanmoins, de manière assez surprenante comparé aux données de RNA-seq (Publication en préparation), notre analyse du H-Score n'a pas permis de mettre en évidence de sur-expression de *Clec7a* dans les microglies du parenchyme non-associées à des dépôts amyloïdes (Figure 3.14 B).

Aux stades précoces, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de *Clec7a* dans les microglies semble donc dépendante de leur proximité avec les dépôt amyloïdes.

B.4 Des sous-types différents de microglies

Puisque l'expression des ARNms de *Cst7* et *Clec7a* est augmentée dans les microglies associées aux dépôts et compte tenu de leur hétérogénéité au sein de la population microgliale, nous avons cherché à déterminer si les deux cibles étaient exprimées dans les mêmes cellules ou s'il s'agissait de populations différentes. En combinant le RNAscope pour *Cst7* et *Clec7a* et l'immunofluorescence pour les microglies et les dépôts, nous révélons que les populations microgliales autour des plaques sont complexes.

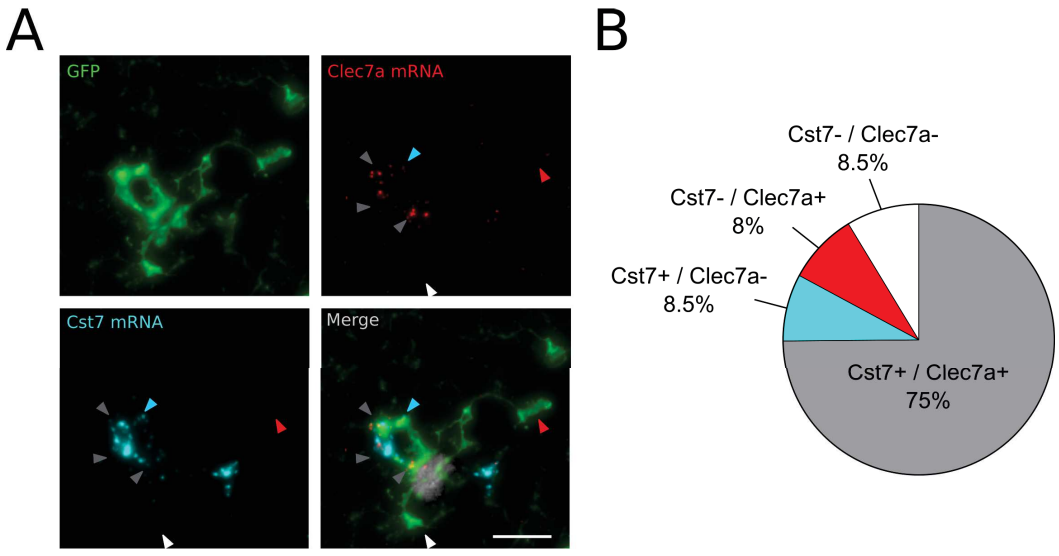


FIGURE 3.15 – **Hétérogénéité microgliale autour des plaques amyloïdes - (A)** Image d'un dépôt amyloïde à 4 mois autour duquel des microglies de différents types sont présentes. GFP pour la microglie, RFP pour l'ARNm de *Clec7a*, Turquoise pour l'ARNm de *Cst7*, et blanc pour le 6E10, l'Aβ. Flèche blanche, microglie négative. Flèche rouge, microglie *Cst7-/Clec7a+*. Flèche turquoise, microglie *Cst7+/Clec7a-*. Flèches grises, microglies *Cst7+/Clec7a+*. Barre d'échelle : 20 μm. **(B)** Quantification du pourcentage des différents types de microglies.

En effet, la majeure partie des microglies (75% des cellules) sont *Cst7*+/*Clec7a*+ (Figure 3.15, flèches grises). Cependant, il existe aussi trois autres sous-populations représentant chacune environ 8% des cellules (Figure 3.15 B) qui sont : soit *Cst7*+/*Clec7a*- (Figure 3.15 A, flèche turquoise), soit *Cst7*-/*Clec7a*+ (Figure 3.15 A, flèche rouge) soit double négatives (Figure 3.15 A, flèche blanche).

B.5 Corrélation avec la pathologie amyloïde

En dernier lieu, nous avons cherché à déterminer si le niveau de sur-expression des cibles et la concentration en amyloïde étaient corrélés. La figure 3.16 montre que le niveau d'expression de *Clec7a* est corrélé avec les concentrations en Aβ_{1-42} que celle ci soit sous forme agrégée (Figure 3.16 A) ou soluble (Figure 3.16 B).

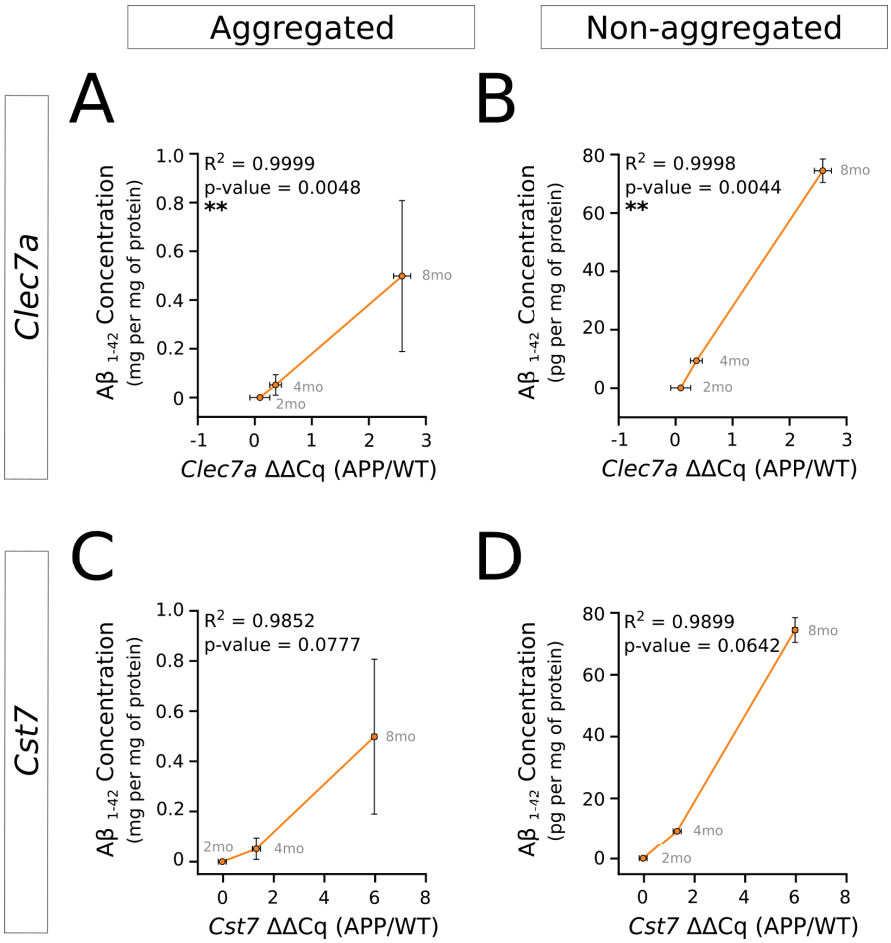


FIGURE 3.16 – **Corrélation entre la concentration d'Aβ_{1-42} et la surexpression des cibles - (A)** Concentration d'Aβ_{1-42} guanidine-soluble (amyloïde agrégé) en fonction du ΔΔCq de *Clec7a*. **(B)** Concentration d'Aβ_{1-42} triton-soluble (amyloïde non-agrégé) en fonction du ΔΔCq de *Clec7a*. **(C)** Concentration d'Aβ_{1-42} guanidine-soluble (amyloïde agrégé) en fonction du ΔΔCq de *Cst7*. **(D)** Concentration d'Aβ_{1-42} triton-soluble (amyloïde non-agrégé) en fonction du ΔΔCq de *Cst7*. Moyenne ± SEM. R^2, Coefficient de corrélation de Pearson, ** p<0.01.

Cette corrélation n'est vraie que pour le peptide Aβ_{1-42} mais ne l'est pas pour les peptides Aβ_{1-40} et Aβ_{1-38} (Résultats non montrés).

De manière intéressante, l'expression de *Cst7* au cours du développement de la MA ne corrèle pas avec la concentration en amyloïde (Figure 3.16 C-D).

B.6 Sur-expression de Dectin-1

Nos expériences d'hybridation *in situ* indiquent que l'expression de *Clec7a* est augmentée dans les microglies associées aux plaques mais pas dans celles du parenchyme. Ayant réussi à faire fonctionner un anticorps contre Dectin-1, le produit de *Clec7a*, nous avons cherché à confirmer cet effet au niveau protéique.

Par immunofluorescence, nous avons observé une sur-expression de Dectin-1, dans les microglies associées aux plaques (Figure 3.17, Haut) mais aussi dans certaines microglies homéostatiques éloignées de tout dépôt amyloïde (Figure 3.17, Milieu).

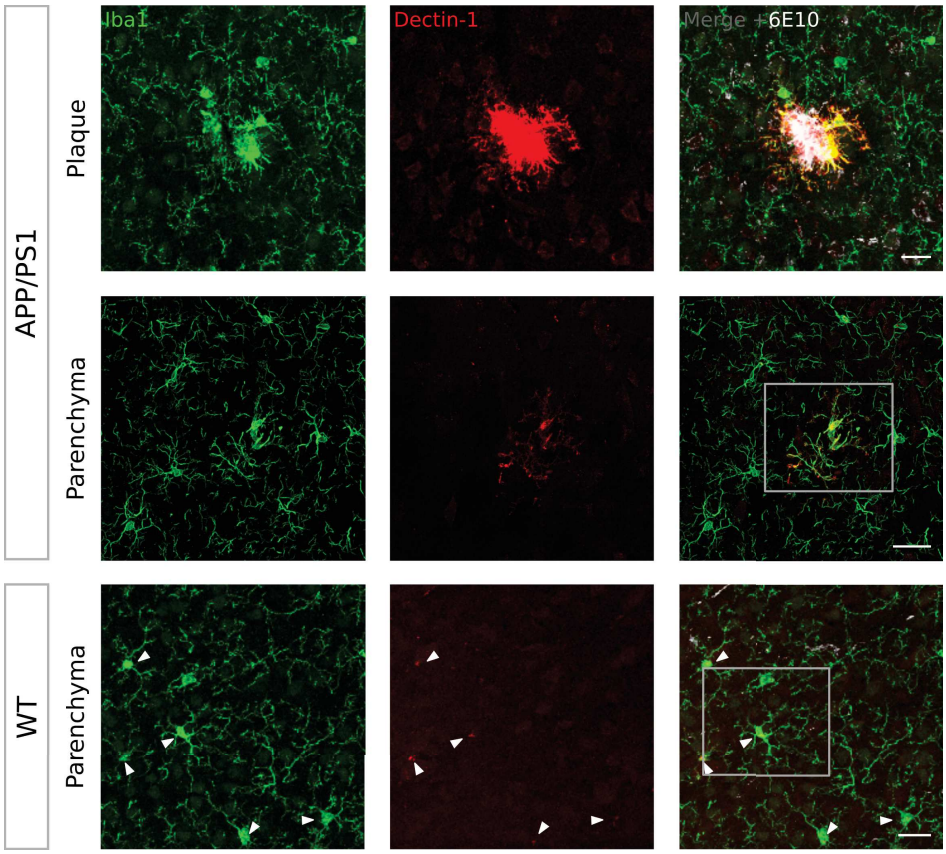


FIGURE 3.17 – **Sur-expression microgliale de Dectin-1 à 4 mois** - Images en immunofluorescence de régions corticales montrant des microglies (IBA1, Vert), Dectin-1 (Rouge) et l'amyloïde (6E10, Blanc) dans le parenchyme des WT (bas) et des APP/PS1 avec (haut) ou sans (milieu) dépôt amyloïde. Tètes de flèche blanche : Dectin-1 intracellulaires. Carré gris : zone de zoom. Barre d'échelle : 20 μm.

De manière intéressante, l'expression de Dectin-1 est aussi détectée chez les souris contrôles. Cependant, l'analyse des images indique que la localisation de Dectin-1 est différente chez les WT et APP/PS1. Alors que chez les contrôles le signal Dectin-1 microglial est localisé dans des vésicules intracellulaires (Figure 3.17 Bas, flèches blanches), dans le cortex des APP/PS1 ce marquage semble plutôt membranaire et plus intense dans les prolongements.

Pour quantifier cette sur-expression de Dectin-1 dans les microglies "homeostatiques" du parenchyme chez les APP/PS1, nous les avons reconstruit en 3D, et nous avons analysé au sein des cellules IBA1$^+$ le volume Dectin-1. Cette méthode révèle que les cellules microgliales dans le parenchyme des APP/PS1 de 4 mois ont tendance à sur-exprimer le récepteur Dectin-1 (Figure 3.18). L'analyse statistique avec le test approprié (Mann-Whitney, Rouge), indique une tendance à la sur-expression. Néanmoins, le calcul de la puissance statistique révèle que cette dernière est inférieure à 60%, ce qui explique certainement pourquoi l'analyse n'atteint pas le seuil de significativité. Pour atteindre une puissance statistique de 90%, il faudrait doubler le nombre de champs, et donc le nombre d'animaux analysés.

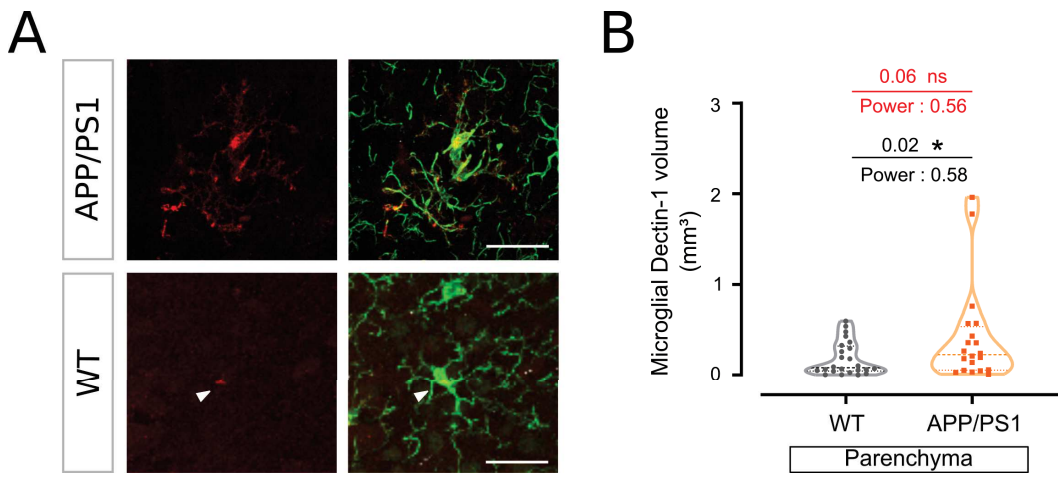


FIGURE 3.18 – **Quantification de l'expression microgliale de Dectin-1 à 4 mois** - **(A)** Zoom de la figure 3.17 montrant l'expression de Dectin-1 (Rouge) dans les microglies (IBA1, Vert). Barre d'échelle : 20 μm. **(B)** Quantification du volume (en mm^3) de Dectin-1 dans les cellules IBA1$^+$ dans le cortex des animaux WT (Gris, n=6) et APP/PS1 (Orange, n=5) à 4 mois. Chaque point représente un champ analysé. Analyse statistique, Rouge : Mann-Whitney, Noir : Unpaired Student t-test, * p<0.05.

C Étude des rôles fonctionnels microgliaux de *Cst7* et *Clec7a*

Les rôles microgliaux de *Cst7* et *Clec7a* sont encore peu connus (voir Introduction partie E). Pour les étudier, nous avons choisi d'utiliser un modèle *in-vitro* : les cellules BV-2.

Bien qu'imparfait, ce modèle est communément utilisé comme un modèle *in-vitro* de cellules microgliales. Grâce à une approche lentivirale, nous avons diminué le niveau d'expression des cibles via l'expression de shRNAs (Voir partie E.2 et Figure 2.5). Cette approche nous a permis de générer des lignées Knock-Down (KD) pour chacun de ces deux gènes (voir Matériels et méthodes section E.2). Nous les avons ensuite utilisées pour comprendre l'implication de *Cst7* et de *Clec7a* dans les fonctions microgliales et le développement de la MA.

C.1 Impact des cibles sur le statut inflammatoire basal

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer si le niveau d'expression des cibles affectait le statut inflammatoire basal des BV-2. Pour quantifier cet état inflammatoire nous avons combiné deux approches : d'une part, une approche par qPCR permettant une analyse transcriptomique globale et d'autre part, une approche cellulaire centrée sur l'expression de l'interleukine-1 (IL-1). Chacune de ces approches présente ses avantages propres : l'approche transcriptomique permet une analyse à moyen débit d'un panel conséquent de gènes liés à l'inflammation, tandis que l'approche protéique est centrée sur une fonction microgliale importante, la libération de cytokines.

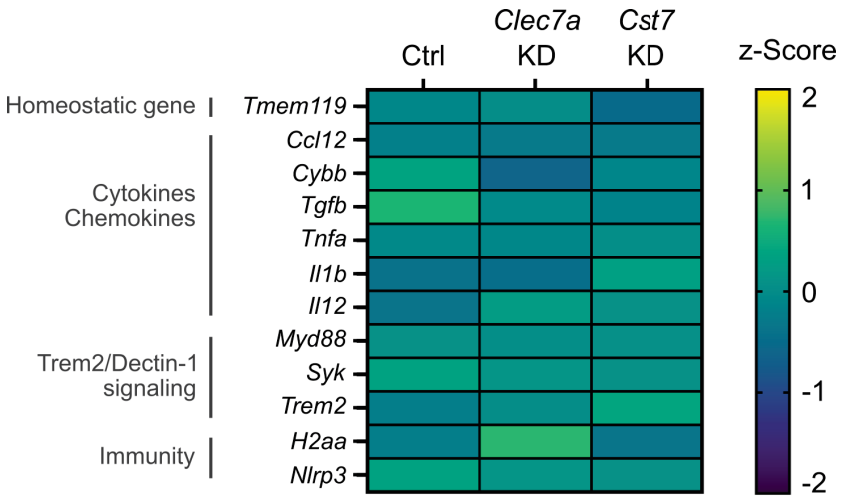


FIGURE 3.19 – **L'invalidation partielle de *Clec7a* ou de *Cst7* ne modifie pas l'état inflammatoire des BV-2** - Heatmap représentant les variations des niveaux d'expression (z-Score) des gènes dans les différentes lignées KD.

C.1.i Analyse transcriptomique à moyen débit

Pour l'analyse transcriptomique, nous avons choisi d'analyser un ensemble de gènes afin d'élucider l'impact des cibles sur :

— l'état homéostatique (*Tmem119*) ;
— l'état inflammatoire (*Ccl12, Cybb, Tgfb, Tnfa, Il1b, Il12*) ;
— les voies de Trem2/Dectin-1 (*Myd88, Syk, Trem2*) ;
— les mécanismes immunitaires (*H2aa, Nlrp3*).

Les résultats présentés sur la Figure 3.19, montrent que la sous-expression de *Clec7a* ou de *Cst7* ne modifie l'expression d'aucun des gènes que nous avons testé et ne semble donc pas suffisante pour induire un changement drastique de l'état inflammatoire basal des cellules.

C.1.ii Concentration en IL-1

Les HEK Blues sont des cellules qui ont été génétiquement modifiées pour exprimer un rapporteur de l'activité du récepteur à l'IL-1. Par lecteur de plaque, il est ainsi possible d'évaluer quantitativement la concentration d'IL-1 sécrétée par les différentes lignées de BV-2.

De manière intéressante, à l'état basal, nos résultats montrent que, comparé à la lignée contrôle, les lignées BV-2 *Cst7*-KD et *Clec7a*-KD présentent une concentration plus faible d'IL-1 dans leur milieu cellulaire (Figure 3.20).

Ces résultats suggèrent que *Clec7a* et *Cst7* participent à la régulation fonctionnelle de la sécrétion basale de l'IL-1.

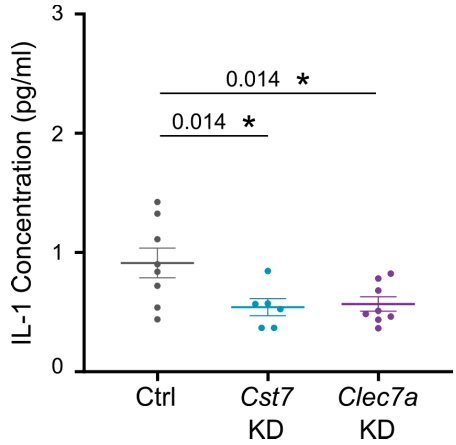


FIGURE 3.20 – **En conditions basales, *Cst7* et *Clec7a* participent à la sécrétion d'IL-1** - Analyse de la concentration en IL-1 (pg/ml) dans le milieu de culture des BV-2 contrôles (Gris), *Cst7*-KD (Turquoise) et *Clec7a*-KD (Lavande). Moyenne ± SEM, n=4 expériences indépendantes. One-way ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, * $p<0.05$.

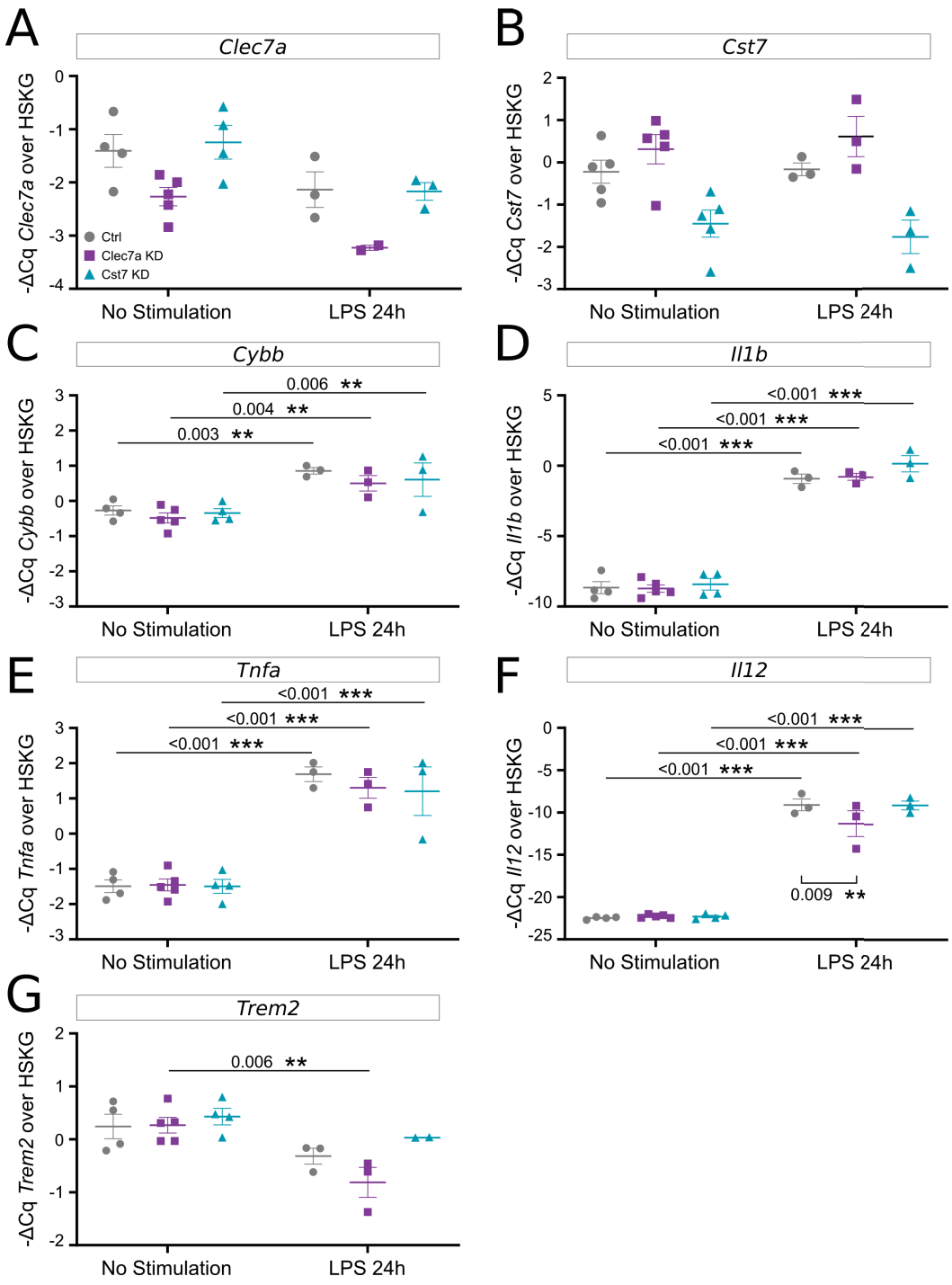


FIGURE 3.21 – **Effets des cibles sur la réponse transcriptomique induite par une stimulation inflammatoire** - Analyse des niveaux d'expression de **(A)** *Clec7a*, **(B)** *Cst7*, **(C)** *Cybb*, **(D)** *Il1b*, **(E)** *Tnfa*, **(F)** *Il12*, **(G)** *Trem2*, dans les BV-2 contrôles (Gris), *Clec7a*-KD (Lavande) et *Cst7*-KD (Turquoise) en condition non stimulées (gauche) ou stimulées avec du LPS à 500 ng/ml pendant 24 h (droite). Chaque point représente une expérience (moyenne de 2-3 puits par expérience). Moyenne ± SEM, n=3-5 expériences indépendantes. Two-ways ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

C.2 Impact des cibles sur la capacité de réponse à un challenge inflammatoire

Nous avons ensuite cherché à déterminer si *Cst7* et/ou *Clec7a* participaient à la réponse inflammatoire. Pour étudier cet effet, nous avons choisi de stimuler les BV-2 avec du LPS pour mimer une réaction inflammatoire globale.

C.2.i Analyse transcriptomique à moyen débit

Dans les BV-2 contrôles, la stimulation au LPS entraîne une réponse inflammatoire caractérisée notamment par la sur-expression de *Cybb*, *Il1b*, *Tnfa* et *Il12* (Figure 3.21 C-F). Au contraire, les niveaux d'expression de *Cst7*, *Clec7a* et *Trem2* ne sont pas affectés (Figure 3.21 A-B, G). Nos résultats révèlent, qu'au niveau transcriptomique, cette réponse inflammatoire n'est globalement pas modifiée dans les lignées KD (Figure 3.21).

Cependant, les BV-2 *Clec7a*-KD semblent réagir de manière un peu différente des autres lignées. En effet, dans cette lignée, en réponse au LPS, la sur-expression d'*Il12* est plus limitée que dans la lignée contrôle (Figure 3.21 F), tandis qu'au contraire le niveau d'expression de *Trem2* est significativement diminué (Figure 3.21 G).

C.2.ii Concentration en IL-1

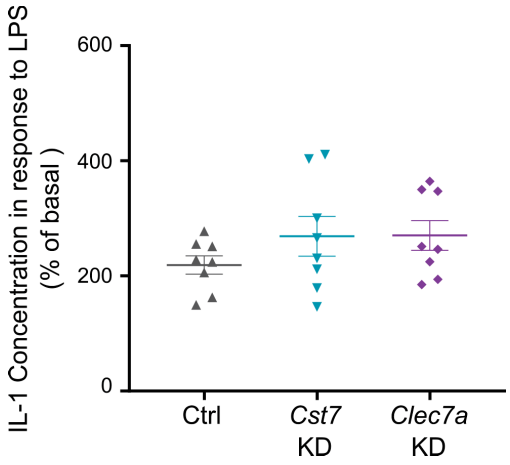


FIGURE 3.22 – **Absence d'impact des cibles sur la sécrétion en IL-1 en réponse à une stimulation au LPS** - Analyse de l'augmentation de la concentration en IL-1 (% de la concentration basale) dans le milieu de culture des BV-2 contrôles (Gris), *Cst7*-KD (Turquoise) et *Cst7*-KD (Lavande) suite à une stimulation au LPS 500 ng/ml pendant 24 h. Chaque point représente un puits. Moyenne ± SEM, n=4 expériences indépendantes, 2 puits indépendants par expérience.

Au niveau fonctionnel, toutes les lignées de BV-2 testées sont capables de répondre

à une stimulation au LPS, et de conduire à la sécrétion d'IL-1 (Figure 3.22). En accord avec l'analyse transcriptomique (Figure 3.21 D), la diminution de l'expression de *Clec7a* et *Cst7* n'a pas d'impact sur la sécrétion en IL-1 en réponse à une stimulation au LPS.

Nos résultats indiquent cependant une certaine variabilité de la réponse, en particulier pour ce qui concerne les lignées KD. Nous avons donc cherché à déterminer si la puissance statistique de notre expérience était suffisante. Les résultats révèlent que, dans le design expérimental actuel, nos chances de découvrir un effet significatif (avec un seuil à 5%), n'est que de 34%. Il faudrait donc augmenter le nombre d'expériences pour vérifier si l'absence de contribution des cibles est réelle.

C.3 Phagocytose

L'une des fonctions microgliales primordiale est la phagocytose. Dans le contexte de la MA cette phagocytose peut-être impactée et jouer un rôle dans la mise en place de la pathologie. De plus, à la périphérie chacune des cibles semble impliquée dans la régulation des processus de phagocytose. Nous avons donc cherché à déterminer si les niveaux d'expression de *Cst7* et/ou *Clec7a* pouvaient impacter ce processus.

Pour évaluer la phagocytose, les cellules BV-2 ont été mises en contact pendant 24 h avec différents substrats fluorescents : le zymosan, l'Aβ ou des billes de latex. La phagocytose de ces éléments par les BV-2 a ensuite été visualisée et quantifiée par microscopie à épifluorescence.

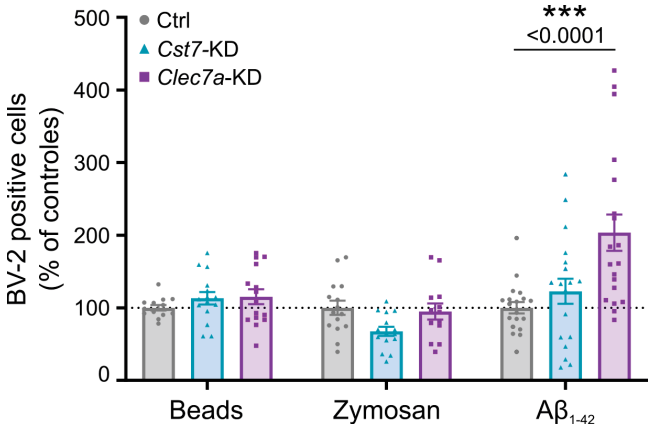


FIGURE 3.23 – **Les cellules *Clec7a*-KD présentent une phagocytose accrue pour l'Aβ_{1-42}** - Quantification du nombre de cellules contenant des billes, du zymosan ou de l'Aβ_{1-42}. Le nombre de cellules est exprimé en % de la condition contrôle. Les trois lignées sont représentées : BV-2 contrôles (Gris), *Cst7*-KD (Turquoise) et *Clec7a*-KD (Lavande). Chaque point représente un champ. Moyenne ± SEM, n=3 expériences indépendantes, 5 champs par condition et par expérience. Two-Ways ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, *** p<0.0001.

Les billes de latex et le zymosan sont phagocytés de la même manière par les lignées

contrôles et les lignées KD, les niveaux d'expression des cibles n'impactent donc la capacité phagocytaire globale des cellules (Figure 3.23).

Pour l'Aβ_{1-42}, la lignée *Clec7a*-KD présente une augmentation significative du pourcentage de cellules contenant des particules fluorescentes (Figure 3.23).

En conclusion, *Cst7* n'est pas un modulateur de la phagocytose. Par contraste, le niveau d'expression de *Clec7a* module la concentration intracellulaire en Aβ_{1-42} dans les BV-2.

C.4 Fonction lysosomale

Les analyses de phagocytose sont basées sur la quantification du nombre de particules (billes, zymosan ou Aβ) dans la population cellulaire à un temps donné. Ce paramètre dépend de deux mécanismes principaux : la capacité des cellules à absorber les particules et leur capacité à les dégrader. Pour décortiquer plus en détail l'effet observé avec le peptide Aβ_{1-42} et déterminer s'il correspondait à une augmentation de l'internalisation de l'Aβ ou à une diminution de sa dégradation, nous avons étudié l'activité endo-lysosomale des cellules. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude globale en population entière. En utilisant un rapporteur pHmétrique, nous avons évalué le pH global des organelles intracellulaires des différents lignées BV-2.

La figure 3.24 montre que les cellules *Cst7*-KD présentent, en moyenne, un pH endo-lysosomal similaire à celui des cellules contrôles. Au contraire, le pH endo-lysosomal global des cellules *Clec7a*-KD est plus acide (Figure 3.24, Violet). L'expression de *Clec7a* semble donc importante pour réguler le pH des organelles intracellulaires des microglies, et pourrait jouer un rôle important dans la dégradation protéique.

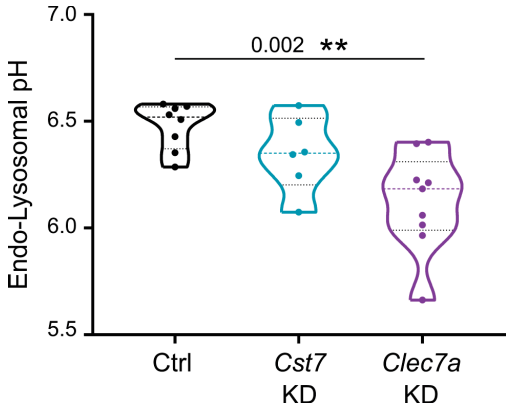


FIGURE 3.24 – **La diminution de l'expression de *Clec7a* induit une acidification des endo-lysosomes** - Mesure du pH endo-lysosomal moyen dans les différentes lignées de BV-2. BV-2 Contrôles (Noir), *Cst7*-KD (Turquoise) et *Clec7a*-KD (Lavande). Chaque point représente un puits. n=3 expériences indépendantes, 3 puits indépendants par expérience. One-Way ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, ** $p<0.01$.

D Implication des cibles dans la pathologie chez l'Homme

Enfin, nous avons voulu valider, chez l'Homme, la pertinence des cibles identifiées. Grâce à une collaboration avec le Dr S. Ginsberg (NYU Neuroscience Institute, New York), nous avons eu accès à une série d'échantillons post-mortems humains provenant d'une cinquantaine d'individus, comptant des patients atteints de MA ou de la maladie de Parkinson (MP) et des donneurs non-déments, considérés ici comme des donneurs sains (voir Materiels et Methodes Section 2.1). Ces échantillons sont constitués de tissus cérébraux non-fixés, provenant de différentes régions corticales. Dans notre analyse, nous nous sommes focalisées sur le cortex préfrontal, l'une des zones atteintes précocement dans la MA. Dans ces échantillons, nous avons mesuré les niveaux d'expression des deux cibles.

L'analyse par qPCR nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de *CST7* (Figure 3.25 A) et *CLEC7A* (Figure 3.25 B) dans le cortex des patients atteints de la MA comparé aux donneurs contrôles non déments.

Dans des modèles murins, nous avons montré un effet de l'âge sur l'expression des cibles (voir Résultats Figures 3.11 et 3.12), nous nous sommes donc aussi intéressées à l'impact de ce facteur chez l'Homme. L'analyse de la corrélation entre le niveau d'expression des cibles et l'âge des patients est présentée en Figure 3.25. Elle montre que, quelque soit la catégorie d'échantillons, l'expression de *CST7* semble indépendante de l'âge (Figure 3.25 C). *A contrario*, l'expression de *CLEC7A* chez les donneurs non-déments augmente avec l'âge comme chez les souris (Figure 3.25 D). De manière intéressante, cet effet de l'âge est totalement perdu chez les patients atteints de pathologies neurodégénératives que ce soit pour les patients atteints de la MA ou ceux atteints de la MP. En effet, même les patients jeunes semblent présenter un niveau d'expression de *CLEC7A* élevé (Figure 3.25 D).

Enfin, nous avons voulu analyser la spécificité de ces cibles entre différentes maladies neurodégénératives. Pour cela nous avons comparé les niveaux d'expression des deux cibles chez les patients atteints de la MA et des patients atteints de la maladie de Parkinson.

L'augmentation de l'expression de *CST7* est spécifique de la MA puisque son expression chez les patients MP n'est pas différente de celles des donneurs non-déments (Figure 3.25 A). Au contraire, la sur-expression de *CLEC7A* semble commune à ces deux pathologies puisque l'expression de ce gène est autant augmenté chez les patients atteints de la MA que chez ceux atteints de la MP (Figure 3.25 B).

L'ensemble des données que nous avons pu recueillir indique que les cibles que nous avons étudiées sont donc des acteurs intéressants de la MA que ce soit dans les modèles murins ou chez l'Homme. Une étude plus poussée de leurs mécanismes d'action permettra de déterminer si elles représentent des cibles de choix en tant que biomarqueurs de

la pathologie et/ou en tant que cibles thérapeutiques pour moduler la mise en place de la MA.

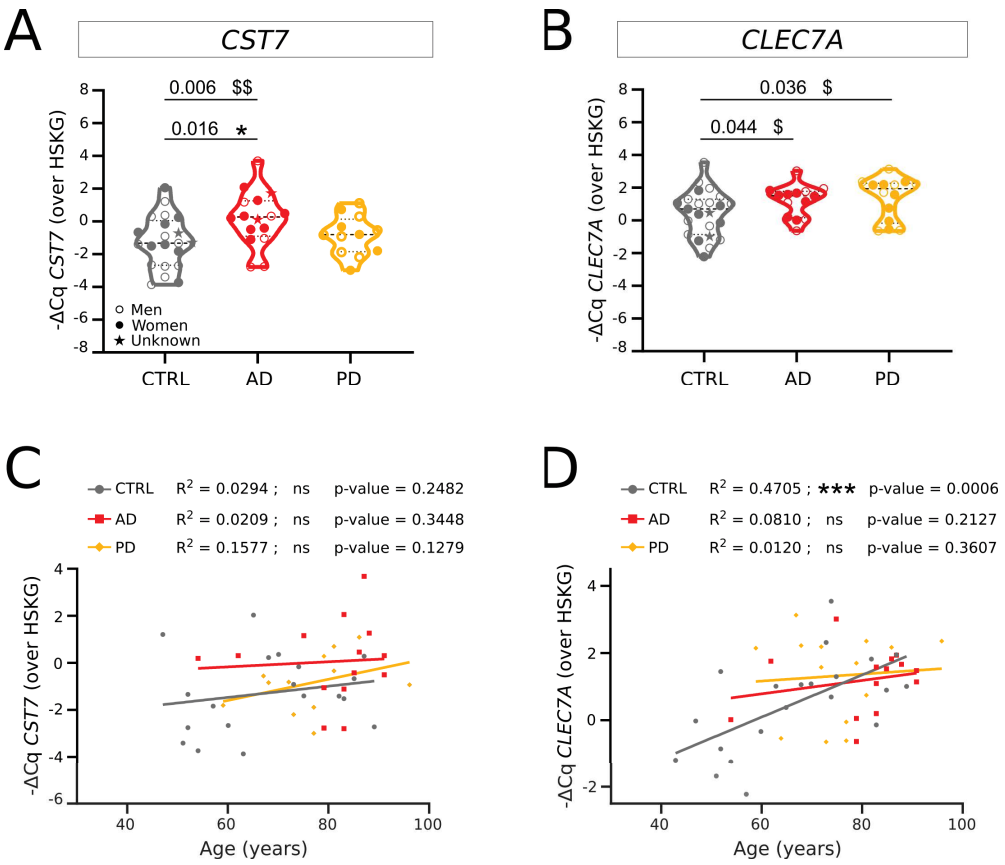


FIGURE 3.25 – ***CST7* et *CLEC7A* sont sur-exprimés dans les tissus de patients atteints de la MA** - Expression de *CST7* **(A)** ou *CLEC7A* **(B)** dans le cortex préfrontal donneurs non déments (Gris), de patients atteints de la MA (Rouge) ou de la MP (Jaune). Chaque point représente un patient ; One-Way ANOVA, comparaisons multiples avec correction par le FDR, * $p<0.05$. Unpaired Student t-test unitaires, \$ $p<0.05$, \$\$ $p<0.01$. Analyse de la corrélation entre le niveau d'expression de *CST7* **(C)** ou *CLEC7A* **(D)** en fonction de l'âge entre les différents groupes. Corrélation de Pearson, *** $p<0.001$.

4

Discussion

A L'amyloïdose, un processus clef dans les modèles murins de la MA

Dans les modèles animaux, le stade précoce a souvent été négligé. Chez les APP/PS1 de 4 mois, la littérature est restreinte et les résultats présentés restent controversés. Le manque de données à cet âge s'explique en grande partie par la complexité d'analyse des stades précoces. En effet, à ces stades les déficits reposent sur des altérations subtiles, de bas grades, d'autant plus difficiles à mettre en évidence qu'elles peuvent être transitoires. Pourtant, l'intérêt de l'étude de ces stades précoces, où les symptômes sont ténus, est majeur pour étudier les facteurs initiateurs de la pathologie.

Malgré le challenge que cela représentait, nous avons, dans notre étude, choisi de cibler cette phase précoce dans le modèle APP/PS1. Nos résultats ont permis de caractériser la cinétique de mise en place d'un certain nombre de facteurs que ce soit au niveau comportemental, histologique ou moléculaire. Bien que certains points restent encore à élucider, ici, nous démontrons que plusieurs altérations débutent dès le stade de 4 mois.

A.1 4 mois, le point de départ de l'amyloïdose

Dans la littérature, différents groupes rapportent l'apparition de quelques plaques denses dés 4 mois, et soupçonnent cet âge d'être le point de départ de l'amyloïdose [Hamilton and Holscher, 2012; Kelly et al., 2017]. Dans notre étude nous avons caractérisé plus précisément cette amyloïdose en réalisant une cinétique fine en ELISA.

Ainsi, nous démontrons que, chez les femelles APP/PS1, 4 mois est l'âge charnière de mise en place de l'amyloïdose. Dès cet âge, mais pas plus tôt, nous mettons en évidence une sur-production de monomères et d'oligomères des différentes espèces d'Aβ, ainsi qu'une augmentation de leur agrégation sous formes de fibrilles.

De manière intéressante, dès 4 mois, nous mesurons une forte concentration en Aβ_{1-38} dans la fraction insoluble uniquement. Ce peptide est très peu étudié, que ce soit dans un contexte physiologique ou pathologique, néanmoins sa pertinence clinique est avérée.

Dans le contexte pathologique de la MA, Dinkel et al. démontrent que les patients atteints de formes sporadiques présentent plus de dépôts Aβ_{1-38} que les patients atteints de formes familiales. De manière surprenante, ces auteurs ne détectent pas cette espèce en ELISA. Comparé aux autres espèces d'Aβ, ce peptide semble avoir une cinétique d'agrégation plus lente et tend à former des fibrilles plus longs [Vandersteen et al., 2012]. Les dépôts d'Aβ_{1-38} étant très fibrillaires, peut-être que celui-ci ne peut être mis en solution et resterait "bloqué" dans la plaque, expliquant pourquoi on ne le détecte pas dans la fraction soluble. De manière intéressante, contrairement aux A$\beta_{1-40/42}$, l'Aβ_{1-38} n'est pas capable d'interagir avec les phospholipides [Chauhan et al., 2000]. Il ne peut donc pas se fixer à la membrane plasmique et participerait différemment à la neurodégénérescence.

Nous avons mis en évidence que cette espèce évolue dès le stade précoce de 4 mois chez les femelles APP/PS1, il serait donc intéressant d'étudier si, et comment, cette espèce module la mise en place de la pathologie.

Étonnamment, alors qu'à 4 mois la surproduction des espèces d'Aβ est avérée, aucune modification du niveau d'expression des gènes des enzymes de dégradation de ces peptides n'est retrouvée. On peut émettre l'hypothèse, qu'à ce stade, les concentrations d'Aβ ne sont peut-être pas suffisantes pour activer la machinerie de dégradation, démontrant le caractère très précoce de cette amyloïdose. Il serait néanmoins intéressant de valider ces résultats au niveau protéique pour comprendre par quel(s) mécanisme(s) l'amyloïdose précoce se met en place.

A.2 Des défauts comportementaux précoces

Hyperlocomotion

De manière intéressante, alors que des études au stade intermédiaire de 7 mois indiquent qu'il n'existe pas d'hyperlocomotion chez les APP/PS1 [Lalonde et al., 2004; Sierksma et al., 2014], un effet plus précoce à 5-6 mois a été soupçonné [Kelly et al., 2017; Da Silva et al., 2016].

Notre étude permet donc de statuer sur la mise en place de ce comportement en confirmant les études précoces. En effet, nous démontrons que l'hyperlocomotion est présente dès 4 mois que ce soit chez les femelles ou chez les mâles (données non-montrées). De manière intéressante, ce phénomène perdure au stade intermédiaire de 8 mois (données non montrées) ; il ne semble donc pas être éphémère mais, au contraire semble, bien refléter l'apparition de la MA.

Défauts d'apprentissage et de mémoire

Par ailleurs, nous nous sommes intéressées aux troubles cognitifs propres à la MA. Pour étudier les défauts cognitifs précoces, nous avons mis en place un protocole calibré d'utilisation du Barnes Maze. Grâce à cette procédure, nous arrivons à démontrer que, dès 4 mois, les femelles APP/PS1 développent des perturbations de la mémoire spatiale à la fois au niveau de l'apprentissage et de la rétention.

La désorientation spatio-temporelle est l'un des signes cliniques précoce de la MA. Chez le rongeur, elle peut être mis en évidence par le test du Hamlet [Crouzier et al., 2018]. Ce test est plus long et plus complexe que le Barnes Maze. En effet, la période d'apprentissage est de deux semaines et l'arène est composée de multiples "rues"/"maisons", en faisant un environnement complexe comportant beaucoup d'indices spatiaux à retenir. Le Hamlet nous a permis de mettre en évidence des défauts de mémorisation encore plus tôt, à 2 mois. Ce test semble donc très sensible et particulièrement adapté pour l'étude des altérations comportementales précoces. Cependant, à l'utilisation, il

semble aussi très sensible aux variations environnementales (bruit, vibrations, etc.) et en pratique, reste donc difficile à utiliser.

Dans la littérature, différents groupes ont cherché à caractériser les défauts d'apprentissage et de rétention chez les APP/PS1 à 4 mois. Ces études reposaient sur l'utilisation de tests tels que le V-maze, le Y-maze, ou le positionnement/reconnaissance d'objet, et concluaient à l'absence de défaut d'apprentissage spatial et de rétention à ce stade précoce [Bonardi et al., 2011; Aso et al., 2012; Zhang and Wang, 2018; Agostini et al., 2020].

Ces résultats, en apparente contradiction avec les nôtres, pourraient s'expliquer par le fait que (i) les tests utilisés dans ces études font appel à des processus cognitifs peu élaborés qui ne permettent pas de mettre en évidence des défauts comportementaux fins et précoces ; et (ii) que le type de mémoires mises en jeu par ces tests, et donc les structures cérébrales impliquées, peuvent être différentes. Dans l'ensemble, la confrontation de ces différents résultats indique que le choix des tests est crucial, certains pouvant être moins adaptés que d'autres pour l'étude des stades précoces (Table 4.1).

En conclusion, nos résultats montrent que les protocoles comportementaux que nous avons mis en place permettent de détecter des altérations cognitives précoces. Grâce à ces protocoles, nous avons mis en évidence pour la première fois des défauts, à la fois de l'apprentissage et de la mémorisation, chez les femelles APP/PS1 de 4 mois.

Test	**Type de mémoire**	**Complexité**	**Structures cérébrales impliquées**
Y/V-Maze	M. de travail / M. spatiale	⋆	Ctx préfrontal
NOR/OIP	M. épisodique / M. spatiale	⋆⋆	Ctx pariétal
BM	M. de travail / M. spatiale	⋆ ⋆ ⋆	Hc Ctx Ent ?
Hamlet	M. topographique	⋆ ⋆ ⋆ ⋆ ⋆	Hc et Ctx (Ent., Piri. et Péri.)

TABLE 4.1 – **Différents tests comportementaux pour étudier l'apprentissage et la mémorisation** - BM, Barnes Maze ; NOR, Novel Object Recognition ; OIP, Object in place - Ctx : Cortex ; Hc : Hippocampe ; Ent : Entorhinal, Pirif : piriforme ; Peri : périrhinal. D'après [Barnes, 1979; Sharma et al., 2010; Wahl et al., 2017; Crouzier et al., 2018].

A.3 Les défauts synaptiques

Les processus d'apprentissage et de mémorisation reposent sur des connexions synaptiques efficaces, et, que ce soit dans la MA ou dans d'autres pathologies neurologiques,

les défauts cognitifs sont souvent associés à des altérations synaptiques. Néanmoins ces études ont principalement été menées à des stades tardifs.

Chez les mâles APP/PS1, une étude à 7 mois, rapporte une absence de modification de l'expression en PSD95 et synaptophysine [Sierksma et al., 2014]. Cependant, cette étude se base sur des homogénats bruts et a été réalisée dans l'hippocampe, une structure probablement encore très peu atteinte à ce stade intermédiaire. À notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur la composition synaptique chez les APP/PS1 de 4 mois.

Pour essayer d'expliquer la mise en place des défauts comportementaux à ce stade, nous nous sommes donc intéressées à caractériser ces éléments synaptiques, acteurs clefs des processus cognitifs. Pour la première fois, nous démontrons, chez les femelles APP/PS1, une déstabilisation synaptique précoce caractérisée principalement par une diminution du niveau d'expression de la synaptophysine et de la PSD95.

La synaptophysine est une protéine responsable de la fusion vésiculaire à la pré-synapse. Ainsi, une diminution précoce en synaptophysine pourrait-être responsable d'un défaut de la libération de divers neurotransmetteurs entraînant une diminution de la transmission synaptique. Confortant cette hypothèse, il a été démontré qu'une altération en synaptophysine induit une augmentation de l'exploration et des défauts d'apprentissage spatial [Schmitt et al., 2009].

PSD95 est une protéine d'échafaudage cruciale au maintien des récepteurs glutamatergiques à la membrane. La diminution en PSD95 que nous avons observé pourrait induire une déstabilisation de l'élément post-synapique et altérer la transmission des informations nerveuses.

Ces déstabilisations des éléments pré- et post-synaptiques sont en accord avec les données de la littérature chez l'Homme. En effet, une méta-analyse de nombreuses publications démontre que, chez des patients diagnostiqués pour la MA, les niveaux d'expression de diverses protéines synaptiques, dont la synaptophysine et la PSD95, sont diminués [De Wilde et al., 2016]. De manière intéressante, il a aussi été montré que, chez les patients MCI (pré-MA), le niveau de PSD95 est réduit et semble lié au développement de la MA [Sultana et al., 2010].

Dans l'ensemble nos résultats suggèrent que les modifications synaptiques précoces que nous avons mis en évidence pourraient, en perturbant l'encodage des informations, engendrer des problèmes de connectivité neuronale et être à l'origine des défauts d'apprentissage et de rétention que nous avons observés.

A.4 La réaction gliale

Puisque la neuroinflammation est l'une des caractéristiques de la MA (Introduction section B.3.iv) et que les données dans la littérature sont encore peu nombreuses et controversées au stade précoce, notre étude a cherché à caractériser la réaction gliale précoce. Nous avons choisi d'aborder cette question en étudiant différents aspects : (i) l'état neuroinflammatoire global, (ii) l'astrogliose et (iii) une étude poussée de la réaction microgliale.

A.4.i L'état inflammatoire global précoce

Notre analyse de divers gènes inflammatoires a permis de mettre en évidence que chez les femelles APP/PS1 de 4 mois, le statut inflammatoire global cortical est peu modifié. Ces résultats sont consistants avec une étude au niveau protéique démontrant qu'à ce stade aucune cytokine classique (IL-6, IL-1β, IL-10, TNFα) n'est sur-exprimée [Agostini et al., 2020].

De manière intéressante, nous avons cependant noté une augmentation du niveau d'expression de *Cxcl10* chez les jeunes femelles APP/PS1. CXCL10 est une chémokine exprimée par les astrocytes [Mills Ko et al., 2014] et les microglies. La fixation de CXCL10 à son récepteur CXCR3, exprimé notamment par les microglies [Biber et al., 2002], permet le recrutement de ces dernières [Biber et al., 2002; Hyo et al., 2008]. Dans le contexte de la SEP, l'expression astrocytaire de CXCL10 semble jouer des rôles délétères [Mills Ko et al., 2014] et permet une activation précoce des microglies [Clarner et al., 2015]. Dans la MA, l'Aβ est capable d'induire une sécrétion de CXCL10 par les astrocytes et les microglies *in-vitro* [Krauthausen et al., 2015]. De plus, cette chémokine fait partie de la signature transcriptomique des microglies réactives de type LRM [Mathys et al., 2017] et du réactome microglial [Hirbec et al., 2018]. De manière intéressante, son récepteur CXCR3 a été impliqué dans la formation des plaques amyloïdes et les défauts cognitifs chez les souris APP/PS1 [Krauthausen et al., 2015].

Dans notre modèle au stade précoce, l'augmentation en *Cxcl10* pourrait donc refléter une réaction gliale précoce, que ce soit au niveau astrocytaire ou microglial. Il serait intéressant de mesurer le niveau d'expression de CXCR3 à ce stade pour déterminer si la signalisation CXCL10-CXCR3 est d'ores et déjà capable de moduler la survenue de la MA [Krauthausen et al., 2015].

A.4.ii La réaction astrocytaire

Pour quantifier la réaction astrocytaire, nous avons analysé la surface GFAP+ et n'avons pas mis en évidence d'astrogliose. Cette analyse reste néanmoins trop simpliste pour permettre de conclure quant à l'absence de réaction astrocytaire au stade précoce. En effet, il est possible que les astrocytes, comme les microglies, réagissent de manière plus complexe à ce stade précoce. Un consensus récent a statué sur les problèmes liés à l'utilisation de ce seul marqueur pour quantifier les astrocytes réactifs [Escartin et al., 2021]. Le niveau d'expression de la GFAP pouvant varier dans différentes conditions physiologiques et pathologiques, ce pannel d'expert recommande de combiner l'analyse de ce marqueur avec d'autres protéines spécifiquement astrocytaires comme ALDH1L1.

CXCL10 étant sécrétée notamment par les astrocytes, l'augmentation de son expression génique pourrait refléter une activation astrogliale précoce qui nécessite d'être approfondie. Ainsi, pour conclure sur la réaction des astrocytes corticaux au stade précoce, il serait intéressant de compléter notre étude en réalisant des marquages complémentaires et/ou en analysant la morphologie astrocytaire.

A.4.iii Une réaction microgliale précoce et complexe

Comme nous l'avons vu en introduction, les données récentes de la littérature suggèrent que la réaction microgliale joue un rôle central dans l'étiologie de la MA [Fan et al., 2017]. Dans notre caractérisation du stade précoce, nous nous sommes donc principalement focalisées sur l'étude détaillée de la réaction microgliale.

Des modifications morphologiques microgliales fines...

Notre analyse globale de la densité en microglies ne révèle aucune hyperplasie microgliale à 4 mois. Cependant, une étude plus poussée de la morphologie des microglies permet de mettre en évidence des altérations précoces. De manière intéressante, ces modifications morphologiques se mettent en place de manière différentielle selon la région cérébrale.

Dans le **cortex**, les microglies des souris APP/PS1 présentent de plus gros corps cellulaires, signe d'une réaction. Au contraire, les caractéristiques de leurs prolongements (complexité, aire couverte) ne sont pas modifiés. L'agrandissement des corps cellulaires pourrait traduire une nécessité de produire plus de protéines, notamment celles impliquées dans la réaction microgliale, en réponse à l'accumulation amyloïde se mettant en place à ce stade dans cette région. Dans cette hypothèse, les microglies auraient cependant toujours besoin d'une grande motilité des prolongements pour bien repérer la zone de danger à cibler et induire des modifications très localisées.

Dans l'**hippocampe**, les changements observés correspondent à une diminution de la complexité des prolongements sans modification de la taille du corps cellulaire. À ce stade, cette structure n'est pas encore touchée par l'hyperproduction d'amyloïde. On pourrait donc penser que les microglies répondent à des perturbations des réseaux neuronaux plutôt qu'à des stimulations par des protéines mal conformées. Une manière de valider cette hypothèse serait de réaliser une étude électrophysiologique de l'activité neuronale dans des tranches d'hippocampes d'animaux de 4 mois. Ainsi, nous pourrions déterminer l'état du micro-environnement microglial de cette structure à cet âge, et comprendre pourquoi ces cellules sont déjà impactées.

Les résultats de l'analyse morphologique sont intéressants mais doivent être interprétés prudemment, car cette approche n'est pas sans biais. En effet, dans la figure supplémentaire n°2 décrivant la méthodologie utilisée [Verdonk et al., 2016], il semblerait que deux microglies soient en contact alors que l'analyse ne compte qu'un gros corps cellulaire. Si la communication microgliale est accrue lors du développement de la MA, la fréquence d'occurrence de ces microglies adjacentes peut augmenter et biaiser l'analyse morphologique. Pour pallier à ce problème, nous pourrions utiliser une autre méthode automatique plus stringente publiée récemment et qui tente de répondre à ce type de problèmes [Salamanca et al., 2019].

... accompagnées d'un remodelage transcriptomique

Dans une étude précédente nous avons démontré que les microglies issues du parenchyme des APP/PS1 présentent un transcriptome modifié comparé aux microglies des animaux contrôles du même âge (Introduction section D.3, publication en préparation). Ces résultats associés à l'étude morphologique permettent de soupçonner une réaction microgliale fine et très précoce.

Ainsi, notre étude permet de conclure que les microglies, dès 4 mois, subissent des modifications fines et tendent vers un phénotype réactif. Si jusqu'à présent cette réaction microgliale précoce n'avait pas été mise en évidence, c'est probablement parce que la plupart des études se basent uniquement sur le nombre de cellules, un paramètre un peu grossier.

La réaction microgliale est-elle impliquée dans les modifications synaptiques ?

Dans la MA, les microglies sont capables de phagocyter les synapses contenant de l'Aβ ou Tau. De manière intéressante, l'Aβ se lie préférentiellement aux récepteurs glutamatergiques à la synapse, colocalisant à 90% avec PSD95. Il s'agirait ici d'un système de ciblage de la microglie vers un type de synapses particulières, notamment glutamatergiques [Rajendran and Paolicelli, 2018]. Puisque dans notre modèle, l'activation microgliale se met en place en même temps que les défauts synaptiques, il serait donc intéressant de caractériser, au stade précoce, l'interaction microglie-synapse. Ainsi, nous pourrions déterminer si les microglies réactives sont responsables des effets synaptiques que nous observons.

Avec ces nouvelles analyses, nous pourrions conclure quant à la cinétique de mise en place de la réaction gliale : la microglie s'active t-elle avant les astrocytes, en réponse aux astrocytes ou de manière concomitante et indépendante ? Ces questions sont cruciales pour comprendre l'enchaînement des processus physiopathologiques à l'oeuvre dans les phases précoces de la MA. Mieux appréhender l'articulation de ces phases est important pour la caractérisation de biomarqueurs inflammatoires mais aussi pour le développement de nouvelles thérapies visant l'un ou l'autre des types cellulaires.

A.5 Des pistes pour compléter la caractérisation du stade précoce

A.5.i L'effet du sexe

Assez étonnement, la plupart des études utilisant des modèles murins de la MA sont réalisées chez les mâles. Dans notre étude, nous avons choisis de nous focaliser sur les femelles pour les raisons suivantes :

— la MA a une prévalence supérieure chez les femmes,

— les caractéristiques de la MA apparaissent plus précocement et, pour certaines (cf densité en plaques), sont plus fortes chez les souris femelles (voir Annexe B et Introduction),
— enfin pour une question pratique de temps et de coûts il était difficile de comparer les deux sexes pour tous les paramètres. Nous avons privilégié une étude plus exhaustive mais restreinte à un sexe.

Les quelques analyses que nous avons pu effectuer dans les deux sexes chez les APP/PS1 révèlent que l'effet sexe est faible à cet âge. Les analyses dans les autres modèles de la MA (5xFAD, J20 et APP^{NL-F}) n'indiquent pas non plus d'effet majeur du sexe. Par exemple, l'expression de *Cst7* et *Clec7a* ne semble pas dépendante de ce facteur mais plutôt résulter d'un mécanisme commun dû à la mise en place de la pathologie. Pour s'affranchir du biais lié au sexe, il serait tout de même nécessaire de valider, chez les femelles, certains résultats obtenus uniquement chez les mâles, comme la morphologie microgliale.

A.5.ii Valider la spécificité microgliale

Pour les études du transcriptome microglial, nous avons visualisé la microglie grâce au rapporteur GFP exprimé sous le contrôle du promoteur CX_3CR_1. Néanmoins, ce récepteur est exprimé par toutes les cellules myéloïdes de sorte qu'il n'est pas spécifique de la microglie. Il est donc important d'apprécier la spécificité du marquage que nous avons effectué dans le contexte de la MA. En particulier, il faudrait déterminer quel pourcentage des cellules GFP+ correspond à une infiltration de cellules périphériques. Pour répondre à cette question, nous allons combiner les marquages TMEM119, un marqueur considéré comme spécifique de la microglie, et la GFP. De cette manière, nous pourrons déterminer si :

— l'hétérogénéité des microglies autour des plaques pourrait être due à une infiltration monocytaire ;
— l'une des sous populations particulières : double négative, Cst7+/Clec7a- ou l'inverse, correspond à des monocytes infiltrants ;
— il pourrait y avoir une contribution des cellules infiltrantes aux dérégulations observées dans les populations du parenchyme.

A.5.iii L'état de la barrière hématoencéphalique

Pour visualiser cette possible infiltration de monocytes circulants, nous avons essayé de mesurer l'état de la BHE. En effet, à des stades plus tardifs, il a été démontré qu'avec le développement de la MA, la BHE devient perméante [Giannoni et al., 2016], et laisse pénétrer des cellules périphériques dans le parenchyme. Pour tester la perméabilité de la barrière, nous avons réalisé des injections périphériques de Bleu Evans chez des souris de 4 mois (données non montrées). Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas pu mettre en évidence de perméabilité de la barrière chez ces animaux, laissant penser que soit la perméabilité de la BHE est inexistante soit elle est trop subtile pour être détectée

par cette méthode.

Combiné aux informations histologiques sur l'infiltration monocytaire (cf. marquages TMEM119), l'état de la BHE nous permettrait d'obtenir de plus amples connaissances sur l'état du microenvironnement cérébral au stade précoce. En combinant les informations de l'état inflammatoire périphérique avec l'état cérébral nous pourrions mieux comprendre les mécanismes de mise en place de la dérégulation microgliale.

À l'heure actuelle, il n'existe ni traitement efficace ni biomarqueur spécifique de la MA. Pourtant leur nécessité n'est plus à prouver. Alors qu'il sera sûrement impossible de reverser les effets de la maladie aux stades tardifs, on peut espérer qu'en intervenant au stade précoce il sera possible de limiter la progression de la maladie ou d'améliorer la qualité de vie des patients et des aidants.

Malgré leurs imperfections, les modèles animaux restent utiles pour étudier *in-vivo* la progression de la pathologie. L'étude des stades précoces dans ces modèles représente un enjeu important pour la compréhension des mécanismes d'initiation et de développement de la pathologie. Dans cette étude nous avons caractérisé, dans le modèle APP/PS1, la cinétique d'apparition de l'amyloïdose et de la réaction microgliale. Ceci nous a permis de définir la fenêtre temporelle optimale pour la découverte de nouveaux biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques.

B *Cst7* et *Clec7a*, des cibles au stade précoce

Notre analyse transcriptomique des microglies du parenchyme au stade précoce nous a permis de mettre en évidence un remodelage du répertoire des gènes exprimés par les microglies dès l'âge de 4 mois chez les APP/PS1 (Introduction section D.3). Parmi les gènes dérégulés à cet âge, nous nous sommes focalisées sur *Cst7* et *Clec7a*, leur implication à la périphérie dans l'inflammation, la phagocytose et la communication cellulaire (Introduction E.1.i et E.2.iv) en faisant des cibles de choix dans la MA.

B.1 Des candidats intéressants chez l'Homme

En analysant une petite collection d'échantillons de tissus cérébraux humains, nous avons d'abord pu confirmer que *CST7* et *CLEC7A* sont bien up-régulés dans le cortex pré-frontal des patients pour lesquels le diagnostic de la MA est avéré, démontrant ainsi la pertinence de ces deux cibles dans les formes sporadiques et familiales de la MA. La comparaison de l'expression des cibles entre les patients atteints de la MA et ceux atteints de la MP semble indiquer que *CLEC7A* serait commun aux pathologies neurodégénératives tandis que *CST7* serait plus spécifique de la MA. Une étude précédente s'est intéressée à la spécificité de l'expression de la Cystatine-F entre patients atteints de la MA et ceux atteints de la maladie de Creutzfeldt–Jakob (CJD). Comparé aux contrôles, la concentration en Cystatine-F dans le LCR des patients, est significativement plus élevée chez les patients atteints de la MA, mais pas chez ceux atteints de CJD [Nuvolone et al., 2017]. Cette étude complémentaire à la notre laisse

donc penser que l'augmentation en *CST7* induit bien une augmentation de sa protéine effectrice chez les patients et ce de manière potentiellement spécifique pour la MA. Par ailleurs, Krasemann et al. démontrent eux aussi une augmentation de *CLEC7A* chez les patients atteints de MA, plus précisément dans les microglies de type MGnD. Ces études permettent donc de renforcer la validité de nos résultats.

De manière intéressante, notre étude suggère que *CST7* et *CLEC7A* pourraient tous les deux être de bons candidats biomarqueurs des stades précoces de la MA. En effet, chez les individus les plus jeunes, les expressions des deux cibles sont plus élevées chez les patients atteints de la MA que chez les contrôles. *CST7*, mais pas *CLEC7A*, serait aussi un bon biomarqueur des stades tardifs puisque la différence d'expression entre contrôles et patients MA est maintenue chez les sujets âgés. Nos études de corrélation ont été effectuées en utilisant le critère de l'âge pour extrapoler le stade de la MA. Cette façon de faire est réductionniste et il aurait été préférable d'utiliser un score tel que le MMSE pour stratifier les patients, cependant nous ne disposons pas de cette information clinique pour les échantillons auxquels nous avons eu accès.

Ces données préliminaires sont donc intéressantes mais, il serait nécessaire de les confirmer sur une cohorte plus grande comprenant aussi des tissus de patients MCI pour valider une sur-expression des cibles dès les stades précoces.

Jusqu'à présent notre analyse des cibles chez l'Homme a été réalisée sur des tissus post-mortems, ne permettant donc pas de valider réellement les cibles en tant que biomarqueurs. Grâce à une collaboration avec le Dr Sylvain Lehmann (LBPC, CHU de Montpellier), nous avons accès à une collection d'échantillons de LCR associés à des données cliniques et biochimiques. Un de nos objectifs est de quantifier le niveau d'expression des cibles dans ces fluides de patients. Nous pourrions ainsi déterminer si ces dernières, en complément de biomarqueurs existants, peuvent être utiles pour affiner le diagnostic précoce de la maladie.

B.2 Les deux cibles sont surexprimées dans les microglies et au cours de la progression de la pathologie

Une surexpression globale qui corrèle avec la progression de la MA

Dans la littérature, chez les modèles animaux, la surexpression de *Cst7* et *Clec7a* a été démontrée dans les phases tardives de la MA [Keren-Shaul et al., 2017; Sala Frigerio et al., 2019].

Compte-tenu de nos résultats de transcriptomique, nous avons choisi d'analyser la cinétique de l'expression de ces cibles dès les stades précoces et ce, dans différents modèles animaux de la MA. Bien que chacun de ces modèles possède une cinétique de développement de la pathologie qui lui est propre, quelque soit le modèle, nos résultats démontrent que l'augmentation de l'expression des cibles se fait de manière précoce et semble concomitante avec l'apparition des premières caractéristiques de la MA.

Chez les souris **APP/PS1**, l'augmentation de l'expression des cibles est significative à partir de 4 mois, un âge qui correspond à l'apparition d'un grand nombre de

caractéristiques de la MA, qu'il s'agisse de symptômes cognitifs, ou de caractéristiques histologiques et moléculaires.

Pour les **5xFAD**, nous n'avons retrouvé la sur-expression qu'à 4 mois, un stade relativement tardif dans ce modèle lorsque tous les symptômes sont fortement installés. À l'âge pré-symptomatique de 1.5 mois, l'amyloïdose est absente et les cibles ne sont pas encore sur-exprimées. Il serait intéressant de réaliser les qPCR à 2 mois, l'âge réel de mise en place de la pathologie amyloïde chez ces souris pour définir si l'âge d'apparition de la sur-expression coïncide bien avec l'âge d'apparition de l'amyloïdose.

Pour les **J20**, bien qu'à 6 mois, ces souris présentent déjà des défauts cognitifs associés à de la gliose et amyloïdose, le niveau d'expression des cibles n'est pas modifié. La sur-expression n'est visualisée que plus tard, à 9 mois, lorsque les souris sont déjà très atteintes. Ces résultats en apparence contradictoires, pourraient en partie s'expliquer par des différences en termes de région analysée. En effet, chez les J20, la pathologie se met en place d'abord dans l'hippocampe ; nous avons donc utilisé des ARNs provenant de cette structure. Les microglies étant sensibles au microenvironnement dans lequel elles évoluent (voir introduction section A.2.i et résultats), on peut émettre l'hypothèse que dans l'hippocampe, le microenvironnement microglial, est suffisant pour moduler leur réponse transcriptomique.

Enfin, pour les $\mathbf{APP}^{\boldsymbol{NL-F}}$, nous n'avons pour le moment étudié que l'âge de 9 mois. Dans la littérature, cet âge correspond à un stade où l'amyloïdose [Huang et al., 2016; Aladeokin et al., 2019; Sos et al., 2020; de Vidania et al., 2020] et la réaction gliale [Petrache et al., 2019; Aladeokin et al., 2019] se mettent en place mais où les déficits cognitifs ne sont pas encore avérés [Izumi et al., 2018]. Dans un premier temps, l'utilisation de ce modèle KI nous permet de démontrer que l'augmentation de l'expression de *Cst7* et *Clec7a* n'est pas dû à un artefact de surexpression dans les modèles transgéniques dits de première génération. De plus, nous montrons qu'à 9 mois, l'augmentation de l'expression de *Cst7* et de *Clec7a* est déjà élevée, de l'ordre de celle qui est observée aux alentours de 6 mois chez les APP/PS1. Ces résultats confirment les données de la littérature indiquant que ce modèle présente une cinétique de mise en place de la MA plus lente que les modèles transgéniques classiques et représente ainsi modèle pertinent pour l'étude plus fine de la mise en place de la pathologie. Il est intéressant de noter que des résultats préliminaires récemment obtenus (données non montrées) mettent en évidence à la fois un déficit d'apprentissage et de rétention dans le Barnes Maze, et un début de l'amyloïdose chez les femelles homozygotes à cet âge.

En conclusion, l'utilisation d'un grand nombre de modèles nous a permis de montrer que la surexpression de *Cst7* et *Clec7a* est lié au développement de la pathologie amyloïde et est indépendante du modèle murin utilisé. L'un des biais de notre étude est de n'avoir étudié que des modèles amyloïdes. Il serait intéressant de déterminer si l'expression des cibles varie de la même manière dans un modèle Tau ou dans un modèle mixte comme le modèle 3xTg. Ainsi, nous pourrions étudier l'impact de l'hyperphosphorylation de Tau sur le niveau d'expression des cibles. Avec le modèle 3xTg, nous pourrions évaluer un effet synergique entre l'hyperphosphorylation de Tau et la

pathologie amyloïde sur le niveau d'expression de *Cst7* et *Clec7a*.

De manière intéressante, notre résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de *Cst7* et *Clec7a* au cours du vieillissement physiologique laissant supposer que ces deux cibles pourraient être impliquées dans le déclin cognitif non pathologique lié à l'âge. Ces résultats sont aussi compatibles avec l'hypothèse selon laquelle la MA correspondrait à un accélération du vieillissement.

Surexpression microgliale précoce de *Cst7* et *Clec7a* : quel lien avec l'amyloïdose ?

L'approche par qPCR sur tissu entier est une approche processive qui permet, assez rapidement, de tester un grand nombre de conditions expérimentales. Néanmoins c'est, par nature, une approche globale qui ne permet pas de préciser si le gène d'intérêt est exprimé dans un type cellulaire et/ou dans un micro-environnement particulier.

En combinant l'approche smFISH avec une immunohistochimie classique, nous avons pu étudier l'expression des cibles plus en détail. Nous avons d'abord confirmé que *Cst7* et *Clec7a* sont uniquement exprimées dans les microglies. Par ailleurs, au stade précoce de 4 mois, notre étude a permis de mettre en évidence que la sur-expression des cibles a majoritairement lieu au niveau des cellules associées aux dépôts amyloïdes. Remarquablement, notre analyse démontre, au sein de cette population, une hétérogénéité jusqu'alors insoupçonnée. Cette hétérogénéité pourrait dépendre de l'histoire spécifique de chaque microglie recrutée autour de la plaque ou de leur cinétique de recrutement. Par exemple, une microglie ayant déjà réagit à l'Aβ de manière antérieure pourra répondre plus fortement qu'une microglie "naïve". Par ailleurs, une microglie présente au voisinage de la plaque depuis un certain temps aura subi plus de changements transcriptomiques qu'une microglie *primo-arrivante*.

De manière intéressante, nous démontrons aussi une sur-expression des cibles dans certaines microglies du parenchyme qui ne sont pas associées à des dépôts. Dans notre étude de l'amyloïdose, nous avons démontré que les concentrations d'Aβ solubles augmentent dès 4 mois. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ces cellules positives pour *Cst7* et/ou *Clec7a* réagissent à cet Aβ soluble, indétectable en immunohistochimie.

B.3 L'adressage de Dectin-1

En dehors des aspects de surexpression, notre étude immunhistochimique met en évidence une relocalisation de Dectin-1 à la membrane dans les microglies du parenchyme des souris APP/PS1.

À la membrane dans les cellules périphériques, le récepteur Dectin-1 répond aux β-glucanes qui peuvent se retrouver sous formes solubles ou agrégées, tout comme l'amyloïde β. De manière intéressante, Dectin-1 répond plus fortement aux formes agrégées des β-glucanes. Ainsi, dans le contexte de la MA, nous pouvons nous demander si Dectin-1 ne pourrait pas aussi être un récepteur à l'Aβ, nécessitant donc sa localisation

à la membrane. Dans cette hypothèse, il jouerait un rôle de PAMP et participerait à l'initiation de la réponse microgliale face au danger que représente l'Aβ.

B.4 Les rôles fonctionnels complexes de *Cst7* et *Clec7a*

Au sein du SNC, *Cst7* et *Clec7a* semblent réguler la neuroinflammation dans diverses conditions physiologiques et pathologiques [Duan et al., 2018; Shah et al., 2008] (Introduction sections E.1.ii et E.2.v). Néanmoins, à l'heure actuelle, nous n'avons que très peu d'informations sur le rôle microglial de ces cibles.

Pour étudier les fonctions de *Cst7* et *Clec7a* dans les microglies, nous avons d'abord mis en place un panel d'outils. Nous avons généré et sélectionné des vecteurs lentiviraux permettant de diminuer spécifiquement l'expression des cibles. Grâce à ces vecteurs, nous avons développé des lignées cellulaires BV-2 *Knock-Down* pour chacune des cibles ce qui nous a permis de commencer à décortiquer les rôles de chacune dans ce type cellulaire microglial. La synthèse des effets mis en évidence sont résumés dans le tableau 4.2.

B.4.i *Clec7a*, des rôles positifs ou délétères ?

Au stade précoce de la MA, nous montrons une augmentation de l'expression de *Clec7a*. Cette augmentation transcriptomique est associée à une augmentation de l'expression de Dectin-1 qui s'accompagne d'une relocalisation du récepteur vers la membrane plasmique. Au niveau fonctionnel, nos résultats démontrent qu'une diminution de l'expression de *Clec7a* entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en peptide Aβ. Cette augmentation n'est pas associée à une modification générale des capacités phagocytaires de la cellule, mais elle semble spécifique du peptide Aβ. Elle est aussi associé à une diminution du pH des endo-lysosomes.

Dans la MA, une dysfonction de la voie endo-lysosomale (ELN) apparaît dès les stades précoces [Whyte et al., 2017] et a été incriminée dans l'initiation de la pathologie [Nixon, 2017]. Notamment, un grand nombre des facteurs de risques génétiques de la MA sont des gènes impliquées dans l'ELN [Nixon, 2017]. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré qu'un défaut de régulation du pH lysosomal peut altérer les capacités de dégradation de l'Aβ [Bonam et al., 2019]. Une altération de certains composants de l'ELN peut aussi être liée à des défauts de LTP et ainsi moduler l'apprentissage et la mémorisation [Nixon, 2017; Hwang et al., 2019]. Jusqu'à présent les études s'intéressant aux perturbations d'ELN se sont uniquement focalisés sur les neurones puisque des mutations des présénilines semblent impacter fortement l'ELN [Nixon, 2017]. Pourtant, les facteurs de risques génétiques de la MA impliqués dans l'ELN sont des gènes exprimés quasi-exclusivement (*PICALM, BIN1, SORL1, ABCA7*) ou en partie par les microglies (*APOE, MS4A*). Ainsi, la microglie semble être une cible de choix pour étudier les perturbations précoces de l'ELN dans la MA.

La modulation du pH de l'ELN par *Clec7a* dans les microglies pourrait limiter la dégradation de l'Aβ par ces cellules, augmentant par ricochet sa concentration extracel-

lulaire et favorisant ainsi son agrégation. À ce stade, les mécanismes mis en jeu restent encore très spéculatifs et doivent être confirmés par des expériences complémentaires. Néanmoins, les altérations précoces que nous avons identifiées pour *Clec7a* sont compatibles avec un rôle de cette cible dans la mise en place de l'amyloïdose.

Des expériences de microscopie *live* sont en cours pour analyser plus en détail cette perturbation de l'ELN dans les cellules *Clec7a*-KD. En effet, il serait intéressant de déterminer si la diminution globale de pH que nous avons observée sur l'ensemble de la population cellulaire est due à une acidification de l'ensemble des organelles ou s'il s'agit d'une augmentation du nombre de lysosomes sans perturbation des endosomes.

En dehors de son action au niveau de la voie endo-lysosomale, *Clec7a* semble aussi être un régulateur de la réponse inflammatoire. En effet, en condition inflammatoire, nous avons montré que le niveau d'expression de *Clec7a* participe à la régulation du niveau d'expression d'*Il-12*. L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire dont l'expression est augmentée dans les microglies de modèles murins de la MA [Vom Berg et al., 2012; Eede et al., 2020] et dans les fluides de patients atteints de la MA [Vom Berg et al., 2012; Pedrini et al., 2017]. Dans ce contexte pathologique, une diminution de l'IL-12 permet de réduire l'amyloïdose [Vom Berg et al., 2012; Eede et al., 2020] et de restaurer les capacités mnésiques des souris [Vom Berg et al., 2012]. De manière intéressante, l'élévation de la concentration en p40, un peptide commun à l'IL-12 et l'IL-23, dans les fluides de patients corrèle avec leurs performances cognitives [Vom Berg et al., 2012] et semble prédire la pathologie amyloïde [Pedrini et al., 2017]. Ce peptide semble être une cible intéressante pour la prévention et le traitement de la MA puisque un candidat-médicament ciblant la p40 est actuellement en développement (Brevet déposé EP2661445A2). La diminution de l'expression l'*Il-12* engendrée par la diminution de l'expression de *Clec7a* pourrait donc avoir un rôle positif en limitant la pathologie dans les phases précoces de la MA.

Nous avons aussi montré que *Clec7a* participe aussi à la régulation du niveau d'expression de *Trem2* en réponse à un stimulus inflammatoire. Les fonctions de *Trem2* dans la pathogénèse de la MA sont complexes et encore débattues (Introduction section C.1.ii). *In-vitro*, le TREM2 microglial facilite la phagocytose de l'Aβ_{1-42} [Jiang et al., 2014]. De plus le variant rs75932628, qui cause la mutation perte de fonction R47H, est associé à une augmentation du risque de développer la MA [Guerreiro et al., 2013]. Ainsi, dans notre contexte, une diminution de l'expression de *Trem2* consécutive à la diminution de l'expression de *Clec7a* pourrait être responsable d'une diminution de la phagocytose d'Aβ et serait plutôt néfaste pour le développement de la pathologie.

Dans l'ensemble, nos données semblent indiquer qu'au stade précoce, lorsque la neuroinflammation commence à se mettre en place, l'augmentation de l'expression de *Clec7a* participe à la mise en place de la réponse inflammatoire, sans que l'on puisse pour l'instant prédire si les conséquences seront globalement positives, néfastes ou neutres.

En conclusion, induire une diminution du niveau d'expression de *Clec7a* dans les microglies au stade précoce de la MA aurait des effets mitigés. D'une part, cette di-

minution pourrait être bénéfique en limitant l'inflammation notamment due à l'IL-12. D'autre part, elle pourrait être délétère en modulant l'expression de TREM2 et en inhibant la dégradation du peptide Aβ. Dectin-1 semble donc jouer des rôles complexes de régulateur de divers mécanismes impliqués dans les stades précoces de la MA.

À la périphérie, l'activation de Dectin-1 est médiée par un grand nombre de voies moléculaires intracellulaires (SYK, TLR ou TTSPAN, Introduction section E.2.iii). Dans les microglies, au stade précoce, il serait intéressant d'évaluer les niveaux d'expression de ces partenaires pour déterminer par quelle(s) voie(s) Dectin-1 agit dans ces cellules.

B.4.ii Les rôles de *Cst7* restent à déterminer

Au stade précoce de la pathologie, l'expression de *Cst7* est augmentée de manière significative dans les cellules microgliales. L'expression de ce gène semble d'ailleurs plus sensible à la pathologie que celle de *Clec7a*.

Les rôles fonctionnels de *Cst7* ont été étudiés en parallèle de ceux de *Clec7a*. Néanmoins, notre compréhension des rôles de cette autre cible reste pour l'instant très faible.

En effet, nos résultats indiquent que *Cst7* n'est pas impliqué dans la réponse inflammatoire induite par un stimulus général et qu'il ne module ni la phagocytose, ni le pH des organelles intracellulaires. Toutefois, *Cst7* semble impliqué dans la régulation de l'état inflammatoire basal. Ainsi, l'inhibition de l'expression de *Cst7* induit une diminution de la sécrétion basale d'IL-1 sans modifier le niveau d'expression d'*Il-1b*. Ces résultats semblent contradictoires mais deux explications sont possibles. Premièrement, la régulation protéique pourrait être invisible au niveau transcriptomique s'il s'agit d'une diminution de la sécrétion ou si la fenêtre temporelle ne permet pas de visualiser la diminution de production. Deuxièmement, cet effet pourrait être dû à une diminution de l'expression de l'IL-1α spécifiquement. En effet, les HEK Blue permettent la quantification de la concentration d'IL-1 sans distinction entre l'IL-1β et l'IL-1α tandis qu'en qPCR nous ne nous sommes intéressées qu'à l'*Il-1b*.

À la périphérie, la Cystatine-F est un régulateur des cathepsines et granzymes et la majeure partie de ses effets semblent passer par ces effecteurs. Pour comprendre les fonctions de cette cible dans les cellules microgliales, il serait intéressant de mesurer l'impact des niveaux d'expression de *Cst7* sur l'activité des cathepsines et granzymes.

De plus, dans les cellules immunitaires, la Cystatine-F est une protéine sécrétée impliquée dans la communication cellulaire. Les rôles de *Cst7*/Cystatine-F dans la MA sont donc peut-être liés à cette communication cellulaire plutôt qu'à un rôle d'effecteur à proprement parler. Ce pourrait être une molécule signal sécrétée par les microglies permettant d'alerter les cellules voisines.

B.4.iii Un effet synergique entre les deux cibles ?

L'étude par smFISH a permis de démontrer que 75% des microglies associées aux plaques expriment à la fois *Cst7* et *Clec7a*. On peut donc se demander s'il existe un cross-talk fonctionnel entre ces deux cibles.

Fonction	***Cst7*-KD**	***Clec7a*-KD**
Pourcentage de cellules positives pour l'Aβ	=	↗
pH Endo-Lysosomal global	=	↘
Inflammation basale	↘	↘
Réponse inflammatoire	=	↘ *Trem2* moins d'*Il-12*

TABLE 4.2 – **Synthèse des fonctions mises en évidences pour *Cst7* et *Clec7a***

Durant ma thèse j'ai réalisé une lignée KD à la fois pour *Cst7* et *Clec7a*. Les résultats préliminaires avec cette lignée ne nous ont pas permis de mettre en évidence de modification du statut inflammatoire basal pour cette lignée. Les expériences de phagocytose et de réponse inflammatoire, sont en cours d'acquisition et d'analyse. Cependant il faut noter que dans cette lignée, les diminutions d'expression de *Cst7* et de *Clec7a* sont moindres comparées à celles obtenues respectivement dans les deux lignées unitaires. Il est donc possible que le niveau de diminution ne soit pas suffisant pour induire des effets. L'analyse de cette lignée ou d'une lignée présentant des niveaux d'expressions comparables à ceux atteints dans les lignées unitaires, permettra de comprendre l'interaction fonctionnelle entre les deux cibles.

B.5 Perspectives pour l'étude fonctionnelle des cibles

B.5.i Vers un modèle plus physiopathologique

Pour des raisons techniques, pour l'instant, nous n'avons pu réaliser que les lignées de sous-expression des cibles. Pour autant, dans les différents modèles animaux et chez l'Homme, le niveau d'expression des cibles est augmenté. Pour la suite nous allons donc utiliser une approche lentivirale pour induire une augmentation de l'expression des cibles dans les BV-2. En réalisant les mêmes analyses que celles présentées ici, nous pourrons ainsi comprendre l'effet réel de la sur-expression microgliale de ces cibles.

B.5.ii Un modèle *in-vitro* à affiner

Les cellules BV-2 sont couramment utilisées et semblent être un bon modèle d'étude de la microglie. En effet, elles sont capables de répondre à des stimuli inflammatoires, elles phagocytent différentes protéines et activent les astrocytes. Cependant, les BV-2 restent des cellules immortalisées qui ne sont pas parfaitement similaires à des microglies primaires [Horvath et al., 2008; Henn et al., 2009; Stansley et al., 2012]. Il serait donc intéressant de confirmer nos résultats dans des cultures primaires de microglies. Il existe de nombreux protocoles de cultures de microglies [Hirbec et al., 2020]. Pour obtenir des microglies aussi proches que possible de l'état homéostatique, et s'assurer de la validité des mécanismes démontrés, nous implémentons au laboratoire le protocole défini par Bohlen et al. [2017].

Par ailleurs, nous projetons aussi étudier l'expression de ces cibles dans des cultures de microglies dérivées d'hiPSC obtenues à partir de patients atteints de formes sporadiques ou familiales de la MA. Pour atteindre une meilleure différentiation microgliale, ces cellules sont cultivées en 3D dans des réseaux neuraux (NSCs) contenant les différents types cellulaires du SNC. Grâce à cet outil translationnel, nous pourrons étudier la cinétique de l'expression des cibles au cours de la maturation des réseaux neuraux. Nous pourrons mener ces études à la fois pour des cultures dérivées d'hiPSCs provenant de formes sporadiques, plus fréquentes, et de formes familiales. La modularité de ce type de cultures nous permettra d'appréhender, dans des cellules humaines, le rôle des cibles dans la communication inter-cellulaire au cours du développement de la MA.

L'ensemble de ces résultats permettra d'améliorer nos connaissances sur l'évolution de ces cibles chez l'Homme. Cette future étude nous permettra aussi de confirmer si *Cst7* et/ou *Clec7a* représentent des biomarqueurs précoces ou des cibles thérapeutiques innovantes.

C Les fondations pour un nouveau projet de recherche

L'ensemble des résultats que j'ai obtenus sur le stade précoce et sur l'implication de *Clec7a* à ce stade pose les bases pour l'élaboration d'un nouveau projet de recherche. Puisque mes résultats suggèrent que Dectin-1 microglial contribue à la mise en place de la pathologie amyloïde, il serait intéressant de mesurer, *in-vivo*, l'impact d'une invalidation de ce récepteur sur l'initiation et la progression de la MA.

Pour cela, nous pourrions croiser des souris $CX_3CR_1^{creERT2}$ disponibles à l'IGF, avec des souris Dectin-1^{flox} qui ont été générées par une équipe Toulousaine [Galès et al., 2010] de manière à obtenir une lignée KO conditionnelle de Dectin-1 dans les microglies. Dectin-1 est un régulateur important de diverses fonctions immunitaires à la périphérie, l'utilisation d'un KO conditionnel des microglies semble donc plus adapté qu'un KO total. Néanmoins, comme CX_3CR_1 est exprimé dans toutes les cellules myéloïdes, le protocole de traitement devra être bien calibré. Ainsi, pour être certain de ne mesurer que l'effet microglial et non périphérique de cette déplétion, il faudrait laisser environ 15 jours après le traitement tamoxifène pour que les cellules immunitaires de la périphérie ait le temps de se renouveler et de retrouver leur niveau basal d'expression de Dectin-1. Il faudrait aussi garder à l'esprit que les microglies sont capables de se renouveler et que la déplétion pourrait s'amoindrir au cours du temps.

Ces souris $CX_3CR_1^{creERT2}$:Dectin-1^{flox} seraient ensuite croisées avec le modèle murin APP^{NL-F}. Par apport aux APP/PS1, le modèle APP^{NL-F} présente différents avantages. Premièrement, il s'agit d'un modèle KI permettant de s'affranchir des effets non spécifiques dûs à la surexpression. Deuxièmement, ce modèle présente une cinétique plus lente d'apparition des symptômes de la MA permettant une fenêtre plus large d'étude des stades précoces. Enfin, la plupart des patients atteints des formes familiales de la MA portent les mutations en hétérozygote, l'utilisation de ce génotype serait donc intéressante bien que coûteuse à mettre en oeuvre. Ainsi, ce modèle permettrait d'étudier

le rôle du récepteur Dectin-1 microglial *in-vivo* au cours du développement de la MA dans un modèle murin plus pertinent.

Plus précisément, pour bien comprendre le rôle de Dectin-1 dans la MA, il serait intéressant de réaliser l'invalidation de Dectin-1 à différents stades de la pathologie (Figure 4.1) :

1. Un stade précoce lors de l'initiation des symptômes de la MA : 9 mois chez les femelles selon nos résultats préliminaires. Cet âge permettrait de mesurer l'impact de la délétion en Dectin-1 pour un traitement plutôt préventif ;
2. Un stade tardif, d'environ 14 mois, lorsque les déficits sont déjà bien installés, pour mesurer un effet curatif de la diminution microgliale de Dectin-1.

En soumettant ces animaux aux tests comportementaux dont nous avons montré qu'ils sont pertinents pour détecter des altérations cognitives précoces (c.f. : Openfield, Barnes Maze et Hamlet), nous pourrons mesurer un impact cognitif de l'ablation en Dectin-1. Pour compléter l'étude, nous réaliserons des analyses histologiques et moléculaires (amyloidose et microgliose).

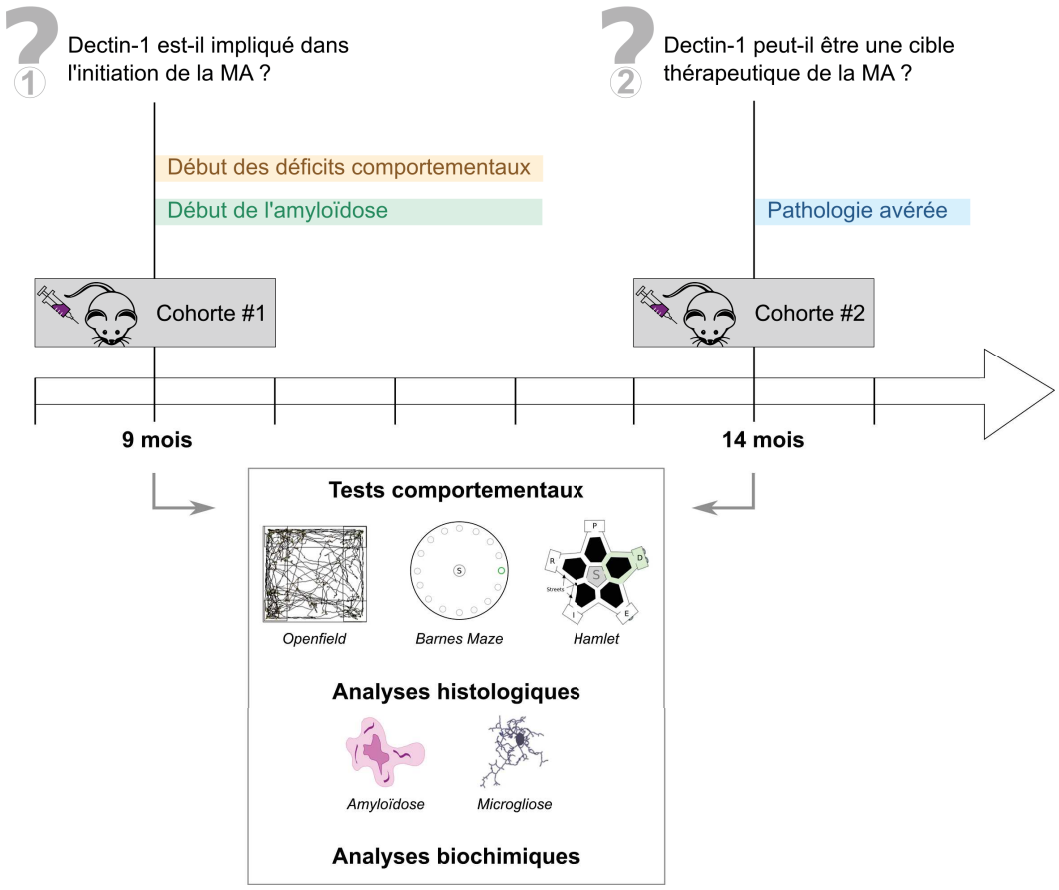


FIGURE 4.1 – **Dectin-1 une cible thérapeutique dans la MA ? Protocole d'évaluation**

In fine, ce projet permettrait de déterminer si la diminution de l'expression de Dectin-1 dans les microglies est capable, à elle seule, de réduire/ralentir l'apparition de la pathologie. Il permettrait aussi de déterminer si Dectin-1 est impliqué au stade précoce, au stade tardif ou aux deux. Le rôle de Dectin-1 pourrait être biphasique et dépendant du stade de la pathologie, ainsi nous pourrions comprendre si sa surexpression est bénéfique/délétère à un temps particulier.

5

Conclusion

Dans son ensemble, notre étude a permis de démontrer qu'il est possible d'utiliser des modèles animaux pour étudier les phases précoces de la MA. Chez les femelles APP/PS1, l'âge de 4 mois correspond au début de l'accélération de l'amyloïdose, et représente un stade crucial pour la mise en place de la MA. En effet, nous avons pu mettre en évidence différents déficits comportementaux (hyperlocomotion, défauts d'apprentissage et troubles de la mémorisation) et nous les avons associés à l'apparition d'autres symptômes de la pathologie (déstabilisation synaptique, microgliose et amyloïdose).

Le coeur de mon travail s'est cependant focalisé sur l'étude de deux cibles microgliales particulières, *Cst7* et *Clec7a*, dont nous pensons qu'elles pourraient jouer un rôle important dans les phases précoces de la MA. Dans un premier temps, nous avons démontré que leur niveau d'expression évolue au cours du développement de la MA dans divers modèles animaux (APP/PS1, 5xFAD, J20 et APP^{NL-F}). L'analyse spatiale a ensuite permis de valider que chacun de ces deux gènes représente une cible microgliale d'intérêt et de conclure que les microglies associées aux plaques sont une population hétérogène où chaque microglie présente ses propres modifications transcriptomiques. De manière intéressante, nous avons montré que l'expression microgliale de *Cst7* et Dectin-1 est aussi augmentée dans des microglies indépendamment des formes agrégées d'amyloïde, ce qui confirme qu'au stade précoce les microglies du parenchyme sont aussi réactives.

Du point de vue fonctionnel, nos travaux ont permis de mettre en avant des rôles importants de *Clec7a* dans le modèle microglial BV-2. Ainsi, ce récepteur semble réguler des fonctions microgliales telles que la dégradation du peptide Aβ ou encore la neuroinflammation qui sont cruciales au cours du développement de la MA. Pour autant, nos résultats indiquent que l'implication de ce récepteur dans le développement de la pathologie est complexe et appellent à poursuivre le travail de déchiffrage entrepris.

Les rôles fonctionnels de *Cst7* ne sont pas encore bien compris, et cette protéine semble majoritairement jouer un rôle de régulateur du niveau inflammatoire basal. Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à élucider.

Quelque soit la cible, le chemin est encore long avant que nous puissions caractériser précisément leurs rôles dans la physiopathologie de la MA, mais les outils pour y parvenir sont en partie disponibles.

Enfin, les caractéristiques de l'augmentation de l'expression de *CST7* et de *CLEC7A* dans le cortex de patients atteints de la MA les désignent comme des biomarqueurs intéressants de la pathologie. En particulier, *CLEC7A* pourrait permettre d'aider à discriminer les cas sporadiques chez les sujets jeunes.

En définitive, ce projet de thèse à permis (i) de caractériser le modèle APP/PS1 au stade précoce, (ii) d'améliorer nos connaissances quant à la complexité de l'hétérogénéité microgliale dans le développement de la MA, (iii) de développer des outils pour l'étude fonctionnelle de deux cibles microgliales au stade précoce, et (iv) de commencer à décrypter certains de leurs rôles. Avec un focus sur le stade précoce, nous avons mis en évidence un rôle potentiel du récepteur Dectin-1 microglial dans la mise en place de la MA.

Bibliographie

Abud, E. M., Ramirez, R. N., Martinez, E. S., Healy, L. M., Nguyen, C. H., Newman, S. A., Yeromin, A. V., Scarfone, V. M., Marsh, S. E., Fimbres, C., Caraway, C. A., Fote, G. M., Madany, A. M., Agrawal, A., Kayed, R., Gylys, K. H., Cahalan, M. D., Cummings, B. J., Antel, J. P., Mortazavi, A., Carson, M. J., Poon, W. W. and Blurton-Jones, M. [2017], '**iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases**', *Neuron* **94**(2), 278–293.e9. doi : 10.1016/j.neuron.2017.03.042.

Agostini, A., Yuchun, D., Li, B., Kendall, D. A. and Pardon, M. C. [2020], '**Sex-specific hippocampal metabolic signatures at the onset of systemic inflammation with lipopolysaccharide in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease**', *Brain, Behavior, and Immunity* **83**, 87–111. doi : 10.1016/j.bbi.2019.09.019.

Aguzzi, A., Barres, B. A. and Bennett, M. L. [2013], '**Microglia : Scapegoat, Saboteur, or Something Else ?**', *Neuropathology and Applied Neurobiology* **39**, 45–50. doi : 10.1126/science.1227901.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S. T., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L. F., Mrak, R., MacKenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. and Wyss-Coray, T. [2000], '**Inflammation and Alzheimer's disease**', *Neurobiology of Aging* **21**(3), 383–421. doi : 10.1016/S0197-4580(00)00124-X.

Aladeokin, A. C., Akiyama, T., Kimura, A., Kimura, Y., Takahashi-Jitsuki, A., Nakamura, H., Makihara, H., Masukawa, D., Nakabayashi, J., Hirano, H., Nakamura, F., Saito, T., Saido, T. and Goshima, Y. [2019], '**Network-guided analysis of hippocampal proteome identifies novel proteins that colocalize with Aβ in a mice model of early-stage Alzheimer's disease**', *Neurobiology of Disease* **132**. doi : 10.1016/j.nbd.2019.104603.

Albasanz, J. L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I. and Martín, M. [2008], '**Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease**', *Brain Pathology* **18**(2), 211–219. doi : 10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x.

Allaman, I., Bélanger, M. and Magistretti, P. J. [2011], '**Astrocyte-neuron metabolic relationships : For better and for worse**'. doi : 10.1016/j.tins.2010.12.001.

Alonso, A. D. C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. [2001], '**Hyperphosphorylation induces self-assembly of into tangles of paired helical filamentsstraight filaments**', *PNAS* **98**(12), 6923–6928.

Alonso, R., Pisa, D., Marina, A. I., Morato, E., Rábano, A. and Carrasco, L. [2014], '**Fungal infection in patients with Alzheimer's disease**', *Journal of Alzheimer's Disease* **41**(1), 301–311. doi : 10.3233/JAD-132681.

Alonso, R., Pisa, D., Rábano, A., Rodal, I. and Carrasco, L. [2015], '**Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients contains fungal proteins and DNA**'. doi : 10.3233/JAD-150382.

Alvarez-Fernandez, M., Barrett, A. J., Gerhartz, B., Dando, P. M., Ni, J. and Abrahamson, M. [1999], '**Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site**', *Journal of Biological Chemistry* **274**(27), 19195–19203. doi : 10.1074/jbc.274.27.19195.

Alzheimer, A. [1907], '**über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.**', *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin* **-**(64), 146–148.

Arendash, G. W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E. K., Zacharia, L. C., Cracchiolo, J. R., Shippy, D. and Tan, J. [2006], '**Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β-amyloid production**', *Neuroscience* **142**(4), 941–952. doi : 10.1016/j.neuroscience.2006.07.021.

Ariizumi, K., Shen, G. L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P. R. and Takashima, A. [2000], '**Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning**', *Journal of Biological Chemistry* **275**(26), 20157–20167. doi : 10.1074/jbc.M909512199.

Arnò, B., Grassivaro, F., Rossi, C., Bergamaschi, A., Castiglioni, V., Furlan, R., Greter, M., Favaro, R., Comi, G., Becher, B., Martino, G. and Muzio, L. [2014], '**Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex**', *Nature Communications* **5**. doi : 10.1038/ncomms6611.

Aso, E., Lomoio, S., Lõpez-González, I., Joda, L., Carmona, M., Fernández-Yagüe, N., Moreno, J., Juvés, S., Pujol, A., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Martín, V., Díaz, M. and Ferrer, I. [2012], '**Amyloid generation and dysfunctional immunoproteasome activation with disease progression in animal model of familial Alzheimer's disease**', *Brain Pathology* **22**(5), 636–653. doi : 10.1111/j.1750-3639.2011.00560.x.

Atlason, P. T., Garside, M. L., Meddows, E., Whiting, P. and McIlhinney, R. A. [2007], '**N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor**', *Journal of Biological Chemistry* **282**(35), 25299–25307. doi : 10.1074/jbc.M702778200.

Baek, H., Ye, M., Kang, G.-H., Lee, C., Lee, G., Choi, D. B., Jung, J., Kim, H., Lee, S., Kim, J. S., Lee, H.-J., Shim, I., Lee, J.-H. and Bae, H. [2016], '**Neuroprotective effects of CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells in a 3xTg-AD Alzheimer's disease model**', *Oncotarget* **7**(43), 0–0.

Baldacci, F., Lista, S., Cavedo, E., Bonuccelli, U. and Hampel, H. [2017], '**Diagnostic function of the neuroinflammatory biomarker YKL-40 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases**', *Expert Review of Proteomics* **14**(4), 285–299. doi : 10.1080/14789450.2017.1304217.

Baldwin, K. T., Carbajal, K. S., Segal, B. M. and Giger, R. J. [2015], '**Neuroinflammation triggered by β-glucan/dectin-1 signaling enables CNS axon regeneration.**', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**(8), 2581–6. doi : 10.1073/pnas.1423221112.

Barnes, C. A. [1979], '**Memory Deficits Associated With Senescence : A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat**', *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **93**(1), 74–104.

Baron, R., Babcock, A. A., Nemirovsky, A., Finsen, B. and Monsonego, A. [2014], '**Accelerated microglial pathology is associated with Aβ plaques in mouse models of Alzheimer's disease**', *Aging Cell* **13**(4), 584–595. doi : 10.1111/acel.12210.

Baruch, K., Rosenzweig, N., Kertser, A., Deczkowska, A., Sharif, A. M., Spinrad, A., Tsitsou-Kampeli, A., Sarel, A., Cahalon, L. and Schwartz, M. [2015], '**Breaking immune tolerance by targeting Foxp3+ regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology**', *Nature Communications* **6**. doi : 10.1038/ncomms8967.

Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D. and Tsuang, D. W. [2010], '**Genetics of Alzheimer disease**', *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* **23**(4), 213–227. doi : 10.1177/0891988710383571.

Belinson, H. and Michaelson, D. M. [2009], '**ApoE4-dependent Aβ-mediated neurodegeneration is associated with inflammatory activation in the hippocampus but not the septum**', *Journal of Neural Transmission* **116**(11), 1427–1434. doi : 10.1007/s00702-009-0218-9.

Bellenguez, C., Grenier-Boley, B. and Lambert, J. C. [2020], '**Genetics of Alzheimer's disease : where we are, and where we are going**'. doi : 10.1016/j.conb.2019.11.024.

Bellucci, A., Bugiani, O., Ghetti, B. and Spillantini, M. G. [2011], '**Presence of reactive microglia and neuroinflammatory mediators in a case of frontotemporal dementia with P301S mutation**', *Neurodegenerative Diseases* **8**(4), 221–229. doi : 10.1159/000322228.

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzériat, K. and Escartin, C. [2015], '**Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**(August). doi : 10.3389/fncel.2015.00278.

Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C. and Anrather, J. [2015], '**The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia**'. doi : 10.3389/fncel.2014.00461.

Bernabeu-Zornoza, A., Coronel, R., Palmer, C., Monteagudo, M., Zambrano, A. and Liste, I. [2019], '**Physiological and pathological effects of amyloid-β species in neural stem cell biology**'. doi : 10.4103/1673-5374.262571.

Berthold-Losleben, M., Heitmann, S. and Himmerich, H. [2009], '**Anti-Inflammatory Drugs in Psychiatry**', *Inflammation & Allergy-Drug Targets* **8**, 266–276. doi : 10.2174/187152809789352221.

Biber, K., Dijkstra, I., Trebst, C., De Groot, J. A., Ransohoff, R. M. and Boddeke, H. W. G. M. [2002], '**Functional expression of CXCR3 in cultured mouse and human astrocytes and microglia**', *Neuroscience* **112**(3), 487–497.

Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R. and Bistoni, F. [1990], '**Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus**', *Journal of Neuroimmunology* **27**(2-3), 229–237. doi : 10.1016/0165-5728(90)90073-V.

Bloom, G. S. [2014], '**Amyloid-β and tau : The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis**', *JAMA Neurology* **71**(4), 505–508. doi : 10.1001/jamaneurol.2013.5847.

Bogie, J. F., Stinissen, P. and Hendriks, J. J. [2014], '**Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis**', *Acta Neuropathologica* **128**(2), 191–213. doi : 10.1007/s00401-014-1310-2.

Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B. and Barres, B. A. [2017], '**Diverse requirements for microglial survival, specification, and function revealed by defined-medium cultures**', *Neuron* **94**(4), 759. doi : 10.1016/J.NEURON.2017.04.043.

Bolós, M., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Hernández, F., Rábano, A. and Avila, J. [2016], '**Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia in Vitro and in Vivo**', *Journal of Alzheimer's Disease* **50**(1), 77–87. doi : 10.3233/JAD-150704.

Bonam, S. R., Wang, F. and Muller, S. [2019], '**Lysosomes as a therapeutic target**'. doi : 10.1038/s41573-019-0036-1.

Bonardi, C., De Pulford, F., Jennings, D. and Pardon, M.-C. [2011], '**A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APPswe/PS1dE9 female mice and their relevance to preclinical Alzheimer's disease**', *Behavioural Brain Research* **222**, 89–97. doi : 10.1016/j.bbr.2011.03.041.

Bouchon, A., Hernández-Munain, C., Cella, M. and Colonna, M. [2002], '**A Dap12-Mediated Pathway Regulates Expression of Cc Chemokine Receptor 7 and Maturation of Human Dendritic Cells**', *The Journal of Experimental Medicine* **194**(8), 1111–1122. doi : 10.1084/jem.194.8.1111.

Bouvier, D. S., Jones, E. V., Quesseveur, G., Davoli, M. A., Ferreira, T. A., Quirion, R., Mechawar, N. and Murai, K. K. [2016], '**High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease**', *Scientific Reports* **6**. doi : 10.1038/srep24544.

Bramblett, G. T., Coedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q. and M-Y Lee, V. [1993], '**Abnormal Tau Phosphorylation at Ser3g6 in Alzheimer's Disease Recapitulates Development and Contributes to Reduced Microtubule Binding**', *Neuron* **10**, 1089–1099. doi : 10.1016/0896-6273(93)90057-x.

Brelstaff, J., Tolkovsky, A. M., Ghetti, B., Goedert, M. and Spillantini, M. G. [2018], '**Living Neurons with Tau Filaments Aberrantly Expose Phosphatidylserine and Are Phagocytosed by Microglia**', *Cell Reports* **24**(8), 1939–1948.e4. doi : 10.1016/j.celrep.2018.07.072.

Brites, D. and Fernandes, A. [2015], '**Neuroinflammation and depression : Microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation**'. doi : 10.3389/fncel.2015.00476.

Brites, D. and Vaz, A. R. [2014], '**Microglia centered pathogenesis in ALS : Insights in cell interconnectivity**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**(MAY). doi : 10.3389/fncel.2014.00117.

Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K. and Arrighi, H. M. [2007], '**Forecasting the global burden of Alzheimer's disease**', *Alzheimer's & Dementia* **3**(3), 186–191. doi : 10.1016/j.jalz.2007.04.381.

Brown, G. D. [2006], '**Dectin-1 : a signalling non-TLR pattern-recognition receptor**', *Nature Reviews Immunology* **6**(1), 33–43. doi : 10.1038/nri1745.

Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. J. and Gordon, S. [2003], '**Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans.**', *The Journal of experimental medicine* **197**(9), 1119–24. doi : 10.1084/jem.20021890.

Brown, J., O'Callaghan, C. A., Marshall, A. S., Gilbert, R. J., Siebold, C., Gordon, S., Brown, G. D. and Jones, E. Y. [2007], '**Structure of the fungal β-glucan-binding immune receptor dectin-1 : Implications for function**', *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **16**(6), 1042. doi : 10.1110/PS.072791207.

Brown, R., Lam, A. D., Gonzalez-Sulser, A., Ying, A., Jones, M., Chou, R. C. C., Tzioras, M., Jordan, C. Y., Jedrasiak-Cape, I., Hemonnot, A. L., Jaoude, M. A., Cole, A. J., Cash, S. S., Saito, T., Saido, T., Ribchester, R. R., Hashemi, K. and Oren, I. [2018], '**Circadian and brain state modulation of network hyperexcitability in Alzheimer's disease**', *eNeuro* **5**(2). doi : 10.1523/ENEURO.0426-17.2018.

Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O 'donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., Darnell, R. B. and Warren, S. T. [2001], '**Microarray Identification of FMRP-Associated Brain mRNAs and Altered mRNA Translational Profiles in Fragile X Syndrome**', *Cell* **107**, 477–487. doi : 10.1016/s0092-8674(01)00568-2.

Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P. and Weiner, H. L. [2014], '**Identification of a unique TGF-β–dependent molecular and functional signature in microglia**', *Nature Neuroscience* **17**(1), 131–143. doi : 10.1038/nn.3599.

Cappello, F., Gatti, E., Camossetto, V., David, A., Lelouard, H. and Pierre, P. [2004], '**Cystatin F is secreted, but artificial modification of its C-terminus can induce its endocytic targeting**', *Experimental Cell Research* **297**(2), 607–618. doi : 10.1016/j.yexcr.2004.03.048.

Castellani, R. J., Lee, H.-g., Perry, G., Smith, M. A. and Hyoung-gon Lee, M. [2006], '**Antioxidant protection and neurodegenerative disease : The role of amyloid-f3 and tau**', *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* **21**(2), 126–130. doi : 10.1177/153331750602100213.

Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., Fagan, A. M., Morris, J. C., Mawuenyega, K. G., Cruchaga, C., Goate, A. M., Bales, K. R., Paul, S. M., Bateman, R. J. and Holtzman, D. M. [2011], '**Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- Peptide Clearance**', *Science Translational Medicine* **3**(89), 89ra57–89ra57. doi : 10.1126/scitranslmed.3002156.

Castoldi, A., Andrade-Oliveira, V., Aguiar, C. F., Amano, M. T., Lee, J., Miyagi, M. T., Latância, M. T., Braga, T. T., da Silva, M. B., Ignácio, A., Carola Correia Lima, J. D., Loures, F. V., Albuquerque, J. A. T., Macêdo, M. B., Almeida, R. R., Gaiarsa, J. W., Luévano-Martínez, L. A., Belchior, T., Hiyane, M. I., Brown, G. D., Mori, M. A., Hoffmann, C., Seelaender, M., Festuccia, W. T., Moraes-Vieira, P. M. and Câmara, N. O. S. [2017], '**Dectin-1 Activation Exacerbates Obesity and Insulin Resistance in the Absence of MyD88**', *Cell Reports* **19**(11), 2272–2288. doi : 10.1016/j.celrep.2017.05.059.

Cavaliere, C., Tramontano, L., Fiorenza, D., Alfano, V., Aiello, M. and Salvatore, M. [2020], '**Gliosis and Neurodegenerative Diseases : The Role of PET and MR Imaging**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **14**. doi : 10.3389/fncel.2020.00075.

Cermak, S., Kosicek, M., Mladenovic-Djordjevic, A., Smiljanic, K., Kanazir, S. and Hecimovic, S. [2016], '**Loss of cathepsin B and L leads to lysosomal dysfunction, NPC-like cholesterol sequestration and accumulation of the key Alzheimer's proteins**', *PLoS ONE* **11**(11). doi : 10.1371/journal.pone.0167428.

Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M. A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., Gaillard, M. C., Guillermier, M., Bernier, S., Gaudin, M., Aurégan, G., Joséphine, C., Déchamps, N., Veran, J., Langlais, V., Cambon, K., Bemelmans, A. P., Baijer, J., Bonvento, G., Dhenain, M., Deleuze, J. F., Oliet, S. H., Brouillet, E., Hantraye, P., Carrillo-de Sauvage, M. A., Olaso, R., Panatier, A. and Escartin, C. [2018], '**Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease**', *Acta neuropathologica communications* **6**(1), 104. doi : 10.1186/s40478-018-0606-1.

Chauhan, A., Ray, I. and Chauhan, V. P. S. [2000], '**Interaction of Amyloid Beta-Protein with Anionic Phospholipids : Possible Involvement of Lys 28 and C-Terminus Aliphatic Amino Acids**', *Neurochemical Research* **25**(3), 423–429. doi : 10.1023/a :1007509608440.

Chen, H.-R., Sun, Y.-Y., Chen, C.-W., Kuo, Y.-M., Kuan, I. S., Li, Z.-R. T., Short-Miller, J. C., Smucker, M. R. and Kuan, C.-Y. [2020], '**Fate mapping via CCR2-CreER mice reveals monocyte-to-microglia transition in development and neonatal stroke**', *Science Advances* **6**. doi : 10.1126/sciadv.abb2119.

Chen, L., Saito, T., Saido, T. C. and Mody, I. [2018], '**Novel quantitative analyses of spontaneous synaptic events in cortical pyramidal cells reveal subtle parvalbumin-expressing interneuron dysfunction in a knock-in mouse model of alzheimer's disease**', *eNeuro* **5**(4). doi : 10.1523/ENEURO.0059-18.2018.

Chen, P., Zhao, W., Guo, Y., Xu, J. and Yin, M. [2016], '**CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease : A Target for Neuroprotection.**', *BioMed research international* **2016**, 8090918. doi : 10.1155/2016/8090918.

Chen, W. T., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Sala Frigerio, C., Corthout, N., Qian, X., Laláková, J., Kühnemund, M., Voytyuk, I., Wolfs, L., Mancuso, R., Salta, E., Balusu, S., Snellinx, A., Munck, S., Jurek, A., Fernandez Navarro, J., Saido, T. C., Huitinga, I., Lundeberg, J., Fiers, M. and De Strooper, B. [2020], '**Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease**', *Cell* **182**(4), 976–991.e19. doi : 10.1016/j.cell.2020.06.038.

Chen, Z., Jalabi, W., Hu, W., Park, H. J., Gale, J. T., Kidd, G. J., Bernatowicz, R., Gossman, Z. C., Chen, J. T., Dutta, R. and Trapp, B. D. [2014], '**Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain**', *Nature Communications* **5**. doi : 10.1038/ncomms5486.

Cherry, J. D., Olschowka, J. A. and O'Banion, M. K. [2014], '**Neuroinflammation and M2 microglia : The good, the bad, and the inflamed**'. doi : 10.1186/1742-2094-11-98.

Chiu, I. M., Morimoto, E. T., Goodarzi, H., Liao, J. T., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Muratet, M., Carroll, M. C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R. M. and Maniatis, T. [2013], '**A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model**', *Cell Reports* **4**(2), 385–401. doi : 10.1016/j.celrep.2013.06.018.

Clarner, T., Janssen, K., Nellessen, L., Stangel, M., Skripuletz, T., Krauspe, B., Hess, F.-M., Denecke, B., Beutner, C., Linnartz-Gerlach, B., Neumann, H., Vallières, L., Amor, S., Ohl, K., Tenbrock, K., Beyer, C. and Kipp, M. [2015], '**CXCL10 Triggers Early Microglial Activation in the Cuprizone Model**', *The Journal of Immunology* **194**(7), 3400–3413. doi : 10.4049/jimmunol.1401459.

Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L. and Klein, W. L. [2018], '**The Amyloid-β Oligomer Hypothesis : Beginning of the Third Decade**'. doi : 10.3233/JAD-179941.

Colbert, J. D., Matthews, S. P., Kos, J. and Watts, C. [2011], '**Internalization of exogenous cystatin F supresses cysteine proteases and induces the accumulation of single-chain cathepsin L by multiple mechanisms**', *Journal of Biological Chemistry* **286**(49), 42082–42090. doi : 10.1074/jbc.M111.253914.

Colbert, J. D., Plechanovová, A. and Watts, C. [2009], '**Glycosylation directs targeting and activation of cystatin f from intracellular and extracellular sources.**', *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **10**(4), 425–37. doi : 10.1111/j.1600-0854.2009.00881.x.

Colonna, M. and Butovsky, O. [2017], '**Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration**', *Annual Review of Immunology* **35**(1), 441–468. doi : 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A. [1993], '**Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families**', *Science* **261**(5123), 921–923.

Cortez-Espinosa, N., García-Hernández, M. H., Reynaga-Hernández, E., Cortés-García, J. D., Corral-Fernández, N. E., Rodríguez-Rivera, J. G., Bravo-Ramírez, A., González-Amaro, R. and Portales-Pérez, D. P. [2012], '**Abnormal expression and function of Dectin-1 receptor in type 2 diabetes mellitus patients with poor glycemic control (HbA1c $>$ 8%)**', *Metabolism : Clinical and Experimental* **61**(11), 1538–1546. doi : 10.1016/j.metabol.2012.03.020.

Cotman, C. W., Tenner, A. J., Cummings, B. J., Tenner, A. J. and Cummings, B. J. [1996], '**[3-Amyloid Converts an Acute Phase Injury Response to Chronic Injury Responses**', *Neurobiology of Aging* **17**(5), 723–731.

Courtney, C., Farrell, D., Gray, R., Hills, R., Lynch, L., Sellwood, E., Edwards, S., Hardyman, W., Raftery, J., Crome, P., Lendon, C., Shaw, H., Bentham, P., Bentham, P., Patel, A., Reed, M., Wright, J., Khaw, K. T., Peto, R., Warlow, C., Coates, J., Craddock, N., Harris, J., Lendon, C., Pritchard, A., Sahakian, B., Courtney, C., Craddock, N., Gray, R., Hills, R., Lendon, C., Raftery, J., Sellwood, E., Fitzpatrick, R., Edwards, S., Melzer, D., Woods, K., Richards, R., Ballard, C., Shaw, H., Lilford, R., Stein, K., Crome, P., Williams, A., Lockwood, N., Chambers, C., White, J., Curnyn, E., Hingley, T., Lyons, J., Rudman, S., Scott, D., Walker, M., Goh, S., Krishnan, R., Ram, M., Dadds, K., Baker, S., Ballantyne, S., Clegg, S., Ehtisham, M., Kendall, H., Ritch, S., Simons, M., Sturman, S., Billingham, L., Madeley, P., Mallick, H., Swe, T., Yahia, A., Haworth, J., Edwards, S., ElGohary, T., Davies, R., Ellis, M., Headen, A., Hill, P., Colgate, R., Cope, N., Kinsella, A., Thomas, T., Bryan, S., Yao, G., Bufton, C., Dalziel, J., Godbert, K., Jones, D., Jones, S., May, K., Spillane, J., Staples, V., Wagner, N., Overstall, P., Brown, B., Rayner, I., Sandifer, Q., Bingham, A., Lewis, J., Pathirana, C., Walton, J., Dhariwal, A., Fletcher, M., Mohan, R., Samarasinghe, L., Whan-Kan, C., Nalpass, A., Boden, J., Bassi, S., Bland, J., Hofmans, E., Lidder, J., Santharam, G., Solanki, R., Stones, S., Richards, R., Battin, D., Leung, K., Crome, P., Austin, A., Shaw, S., Simpson, H., Dyer, M., Wychrij, O., Gray, M., Madhu, A., Terry, J., Brown, L., Butler, J., Green, K., Roberts, N., Shaw, S., Singh, I., Thatcher, G., Waghray, S., Campbell, A., Deeks, J., Kingscote-Davies, T., Sneddon, F., Sharpe, K., Stoakley, A., Wears, R., Crofts, F., Grewal, G., Acey, G., Callaghan, A., Chambers, S., Deane, A., Anand, S., Elsmore, J., Khan, M., Stokes, G., Dysch, L., Forrester, L., Job, D., Somerville, J., Surawy, I., Challenger, J., Collier, P., Everett, S., Mansell, D., Rule, J., Evans, J., Morgan, V., Reese, J., Thomas, D., Williams, D., Leggett, S., Martin, P., Shaw, M. and Tarry, J. [2004], '**Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000) : Randomised double-blind trial**', *Lancet* **363**(9427), 2105–2115. doi : 10.1016/S0140-6736(04)16499-4.

Craig, L. A., Hong, N. S. and McDonald, R. J. [2011], '**Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease**'. doi : 10.1016/j.neubiorev.2011.03.001.

Crouzier, L., Gilabert, D., Rossel, M., Trousse, F. and Maurice, T. [2018], '**Topographical memory analyzed in mice using the Hamlet test, a novel complex maze**', *Neurobiology of Learning and Memory* **149**, 118–134. doi : 10.1016/j.nlm.2018.02.014.

Cuello, A. C. [2017], '**Early and Late CNS Inflammation in Alzheimer's Disease : Two Extremes of a Continuum ?**'. doi : 10.1016/j.tips.2017.07.005.

Cunningham, C. L., Martínez-Cerdeño, V. and Noctor, S. C. [2013], '**Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex**', *Journal of Neuroscience* **33**(10), 4216–4233. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013.

Da Silva, S. V., Haberl, M. G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Gonçalves, N., Gorlewicz, A., Malezieux, M., Gonçalves, F. Q., Grosjean, N., Blanchet, C., Frick, A., Nägerl, U. V., Cunha, R. A. and Mulle, C. [2016], '**Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors**', *Nature Communications* **7**. doi : 10.1038/ncomms11915.

Dai, X. M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., Sylvestre, V. and Stanley, E. R. [2002], '**Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects**', *Blood* **99**(1), 111–120. doi : 10.1182/blood.V99.1.111.

Dansokho, C., Ait Ahmed, D., Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., Cagnard, N., Holzenberger, M., Piaggio, E., Aucouturier, P. and Dorothée, G. [2016], '**Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology**', *Brain* **139**(4), 1237–1251. doi : 10.1093/brain/awv408.

Dautović, E., Perišić Nanut, M., Softić, A. and Kos, J. [2018], '**The transcription factor C/EBP α controls the role of cystatin F during the differentiation of monocytes to macrophages**', *European Journal of Cell Biology* **97**(7), 463–473. doi : 10.1016/J.EJCB.2018.07.002.

Davis, D. G., Schmitt, F. A., Wekstein, D. R. and Markesbery, W. R. [1999], '**Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects**', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **58**(4), 376–388. doi : 10.1097/00005072-199904000-00008.

Davis, E. J., Foster, T. D. and Thomas, W. E. [1994], '**Cellular forms and functions of brain microglia**'. doi : 10.1016/0361-9230(94)90189-9.

De Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K. H., Carlson, G. A., Spires-Jones, T. L. and Hyman, B. T. [2012], '**Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease**', *Neuron* **73**(4), 685–697. doi : 10.1016/j.neuron.2011.11.033.

de Vidania, S., Palomares-Perez, I., Frank-García, A., Saito, T., Saido, T. C., Draffin, J., Szaruga, M., Chávez-Gutierrez, L., Calero, M., Medina, M., Guix, F. X. and Dotti, C. G. [2020], '**Prodromal Alzheimer's Disease : Constitutive Upregulation of Neuroglobin Prevents the Initiation of Alzheimer's Pathology**', *Frontiers in Neuroscience* **14**. doi : 10.3389/fnins.2020.562581.

De Wilde, M. C., Overk, C. R., Sijben, J. W. and Masliah, E. [2016], '**Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability**', *Alzheimer's and Dementia* **12**(6), 633–644. doi : 10.1016/j.jalz.2015.12.005.

De Wolf, F., Ghanbari, M., Licher, S., Mcrae-Mckee, K., Gras, L., Weverling, G. J., Wermeling, P., Sedaghat, S., Kamran Ikram, M., Waziry, R., Koudstaal, W., Klap, J., Kostense, S., Hofman, A., Anderson, R., Goudsmit, J. and Ikram, M. A. [2020], '**Plasma tau, neurofilament light chain and amyloid-b levels and risk of dementia ; a population-based cohort study**', *Brain* **143**, 1220–1232. doi : 10.1093/brain/awaa054.

Deardorff, W. J. and Grossberg, G. T. [2019], **Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's dementia and vascular dementia**, *in* 'Handbook of Clinical Neurology', Vol. 165, Elsevier B.V., pp. 5–32. doi : 10.1016/B978-0-444-64012-3.00002-2.

Della Bianca, V., Dusi, S., Bianchini, E., Dal Prà, I. and Rossi, F. [1999], '**Amyloid Activates the O2 Forming NADPH Oxidase in Microglia, Monocytes, and Neutrophils A POSSIBLE INFLAMMATORY MECHANISM OF NEURONAL DAMAGE IN ALZHEIMER'S DISEASE***', *The Journal of Biological Chemistry* **274**(22), 15493–15499.

DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Parsadanian, M., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, J. W., Harmony, J. A., Aronow, B. J., Bales, K. R., Paul, S. M. and Holtzman, D. M. [2004], '**ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress Aβ Levels and Deposition : Evidence that ApoE Regulates Extracellular Aβ Metabolism In Vivo**', *Neuron* **41**(2), 193–202. doi : 10.1016/S0896-6273(03)00850-X.

Dennehy, K. M., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, J. A., Taylor, P. R., Kerrigan, A., Tsoni, S. V., Gordon, S., Meyer-Wentrup, F., Adema, G. J., Kullberg, B. J., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mora-Montes, H. M., Gow, N. A., Williams, D. L., Netea, M. G. and Brown, G. D. [2008], '**Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors**', *European Journal of Immunology* **38**(2), 500–506. doi : 10.1002/eji.200737741.

Dickson, D. W., Lee, S. C., Mattiace, L. A., Yen, S.-H. C. and Brosnan, C. [1993], '**Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease**', *Glia* **7**(1), 75–83. doi : 10.1002/glia.440070113.

Dinkel, F., Trujillo-Rodriguez, D., Villegas, A., Streffer, J., Mercken, M., Lopera, F., Glatzel, M. and Sepulveda-Falla, D. [2020], '**Decreased Deposition of Beta-Amyloid 1-38 and Increased Deposition of Beta-Amyloid 1-42 in Brain Tissue of Presenilin-1 E280A Familial Alzheimer's Disease Patients**', *Frontiers in Aging Neuroscience* **12**. doi : 10.3389/fnagi.2020.00220.

Dionisio-Santos, D. A., Olschowka, J. A. and O'Banion, M. K. [2019], '**Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease**'. doi : 10.1186/s12974-019-1453-0.

Doody, R. S., Massman, P. and Dunn, J. K. [2001], '**A method for estimating progression rates in Alzheimer disease**', *Archives of Neurology* **58**(3), 449–454. doi : 10.1001/archneur.58.3.449.

Duan, W., Ran, H., Zhou, Z., He, Q. and Zheng, J. [2012], '**Adenosine A2A Receptor Deficiency Up-Regulates Cystatin F Expression in White Matter Lesions Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion**', *PLoS ONE* **7**(12). doi : 10.1371/journal.pone.0052566.

Duan, W., Wang, H., Fan, Q., Chen, L., Huang, H. and Ran, H. [2018], '**Cystatin F involvement in adenosine A2A receptor-mediated neuroinflammation in BV2 microglial cells**', *Scientific Reports* **8**(1), 6820. doi : 10.1038/s41598-018-25031-5.

Dubbelaar, M. L., Kracht, L., Eggen, B. J. L. and Boddeke, E. W. G. M. [2018], '**The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes**', *Frontiers in Immunology* **9**. doi : 10.3389/fimmu.2018.01753.

Durose, W. W., Shimizu, T., Li, J. Y., Abe, M., Sakimura, K., Chetsawang, B., Tanaka, K. F., Suzumura, A., Tohyama, K. and Ikenaka, K. [2019], '**Cathepsin C modulates myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis**', *Journal of Neurochemistry* **148**(3), 413–425. doi : 10.1111/jnc.14581.

Eede, P., Obst, J., Benke, E., Yvon-Durocher, G., Richard, B. C., Gimber, N., Schmoranzer, J., Böddrich, A., Wanker, E. E., Prokop, S. and Heppner, F. L. [2020], '**Interleukin-12/23 deficiency differentially affects pathology in male and female Alzheimer's disease-like mice**', *EMBO reports* **21**(3). doi : 10.15252/embr.201948530.

Efthymiou, A. G. and Goate, A. M. [2017], '**Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk**'. doi : 10.1186/s13024-017-0184-x.

El Hajj, H., Savage, J. C., Bisht, K., Parent, M., Vallières, L., Rivest, S. and Tremblay, M. È. [2019], '**Ultrastructural evidence of microglial heterogeneity in Alzheimer's disease amyloid pathology**', *Journal of Neuroinflammation* **16**(1). doi : 10.1186/s12974-019-1473-9.

El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W. and Luster, A. D. [2003], '**CD36 mediates the innate host response to β-amyloid**', *Journal of Experimental Medicine* **197**(12), 1657–1666. doi : 10.1084/jem.20021546.

Ellwanger, D. C., Wang, S., Brioschi, S., Shao, Z., Green, L., Case, R., Yoo, D., Weishuhn, D., Rathanaswami, P., Bradley, J., Rao, S., Cha, D., Luan, P., Sambashivan, S., Gilfillan, S., Hasson, S. A., Foltz, I. N., van Lookeren Campagne, M. and Colonna, M. [2021], '**Prior activation state shapes the microglia responseto antihuman TREM2 in a mouse model ofAlzheimer's disease**', *PNAS* **118**(3), 1–12. doi : 10.1073/pnas.2017742118/-/DCSupplemental.

Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., Deneen, B., De Strooper, B., Díaz-Castro, B., Farina, C., Freeman, M., Gallo, V., Goldman, J. E., Goldman, S. A., Götz, M., Gutiérrez, A., Haydon, P. G., Heiland, D. H., Hol, E. M., Holt, M. G., Iino, M., Kastanenka, K. V., Kettenmann, H., Khakh, B. S., Koizumi, S., Lee, C. J., Liddelow, S. A., MacVicar, B. A., Magistretti, P., Messing, A., Mishra, A., Molofsky, A. V., Murai, K. K., Norris, C. M., Okada, S., Oliet, S. H. R., Oliveira, J. F., Panatier, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Pellerin, L., Perea, G., Pérez-Nievas, B. G., Pfrieger, F. W., Poskanzer, K. E., Quintana, F. J., Ransohoff, R. M., Riquelme-Perez, M., Robel, S., Rose, C. R., Rothstein, J. D., Rouach, N., Rowitch, D. H., Semyanov, A., Sirko, S., Sontheimer, H., Swanson, R. A., Vitorica, J., Wanner, I.-B., Wood, L. B., Wu, J., Zheng, B., Zimmer, E. R., Zorec, R., Sofroniew, M. V. and Verkhratsky, A. [2021], '**Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions**', *Nature Neuroscience* **0**(0), 0–0. doi : 10.1038/s41593-020-00783-4.

Espinosa, J., Rocha, A., Nunes, F., Costa, M. S., Schein, V., Kazlauckas, V., Kalinine, E., Souza, D. O., Cunha, R. A. and Porciúncula, L. O. [2013], '**Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia**', *Journal of Alzheimer's Disease* **34**(2), 509–518. doi : 10.3233/JAD-111982.

Fan, Q., Tao, R., Zhang, H., Xie, H., Lu, L., Wang, T., Su, M., Hu, J., Zhang, Q., Chen, Q., Iwakura, Y., Shen, W., Zhang, R. and Yan, X. [2019], '**Dectin-1 Contributes to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating Macrophage Polarization and Neutrophil Infiltration**', *Circulation* **139**(5), 663–678. doi : 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036044.

Fan, Z., Brooks, D. J., Okello, A. and Edison, P. [2017], '**An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory.**', *Brain : a journal of neurology* **140**(3), 792–803. doi : 10.1093/brain/aww349.

Fernández-Arjona, M. d. M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P. and López-Ávalos, M. D. [2017], '**Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **11**, 235. doi : 10.3389/fncel.2017.00235.

Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santuccione Chadha, A., Baracchi, F., Girouard, H., Misoch, S., Giacobini, E., Depypere, H. and Hampel, H. [2018], '**Sex differences in Alzheimer disease — the gateway to precision medicine**'. doi : 10.1038/s41582-018-0032-9.

Ferwerda, G., Meyer-Wentrup, F., Kullberg, B.-J., Netea, M. G. and Adema, G. J. [2008], '**Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages**', *Cellular Microbiology* **10**(10), 2058–2066. doi : 10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x.

Frandemiche, M. L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F. and Buisson, A. [2014], '**Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers**', *Journal of Neuroscience* **34**(17), 6084–6097. doi : 10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014.

Frank, S., Burbach, G. J., Bonin, M., Walter, M., Streit, W., Bechmann, I. and Deller, T. [2008], '**TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice**', *GLIA* **56**(13), 1438–1447. doi : 10.1002/glia.20710.

Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Scheltens, P. and Thompson, P. M. [2010], '**The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease**'. doi : 10.1038/nrneurol.2009.215.

Fu, X., Zeng, H., Zhao, J., Zhou, G., Zhou, H., Zhuang, J., Xu, C., Li, J., Peng, Y., Cao, Y., Li, Y., Chen, H., Wang, L., Yan, F. and Chen, G. [2021], '**Inhibition of Dectin-1 Ameliorates Neuroinflammation by Regulating Microglia/Macrophage Phenotype After Intracerebral Hemorrhage in Mice**', *Translational Stroke Research* **0**(0), 0–0. doi : 10.1007/s12975-021-00889-2.

Füger, P., Hefendehl, J. K., Veeraraghavalu, K., Wendeln, A.-C., Schlosser, C., Obermüller, U., Wegenast-Braun, B. M., Neher, J. J., Martus, P., Kohsaka, S., Thunemann, M., Feil, R., Sisodia, S. S., Skodras, A. and Jucker, M. [2017], '**Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging**', *Nature Neuroscience* **20**(10), 1371–1376. doi : 10.1038/nn.4631.

Galatro, T. F., Holtman, I. R., Lerario, A. M., Vainchtein, I. D., Brouwer, N., Sola, P. R., Veras, M. M., Pereira, T. F., Leite, R. E. P., Moller, T., Wes, P. D., Sogayar, M. C., Laman, J. D., den Dunnen, W., Pasqualucci, C. A., Oba-Shinjo, S. M., Boddeke, E., Marie, S. K. N. and Eggen, B. J. L. [2017], '**Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes**', *Nat Neurosci* **20**(8), 1162–1171. doi : 10.1038/nn.4597.

Galès, A., Conduché, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olagnier, D., Béraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M. D., Auwerx, J., Coste, A. and Pipy, B. [2010], '**PPARγ controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against Candida albicans**', *PLoS Pathogens* **6**(1). doi : 10.1371/journal.ppat.1000714.

Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. and Underhill, D. M. [2003], '**Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2.**', *The Journal of experimental medicine* **197**(9), 1107–17. doi : 10.1084/jem.20021787.

Gantner, B. N., Simmons, R. M. and Underhill, D. M. [2005], '**Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments**', *EMBO Journal* **24**(6), 1277–1286. doi : 10.1038/sj.emboj.7600594.

Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S. M., Bacskai, B. J. and Frosch, M. P. [2006], '**Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease**', *Neurobiology of Disease* **24**, 516 – 524. doi : 10.1016/j.nbd.2006.08.017.

Gensel, J. C., Wang, Y., Guan, Z., Beckwith, K. A., Braun, K. J., Wei, P., McTigue, D. M. and Popovich, P. G. [2015], '**Toll-Like Receptors and Dectin-1, a C-Type Lectin Receptor, Trigger Divergent Functions in CNS Macrophages**', *Journal of Neuroscience* **35**(27), 9966–9976. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0337-15.2015.

Gentleman, S. M. [2013], '**Review : Microglia in protein aggregation disorders : Friend or foe ?**', *Neuropathology and Applied Neurobiology* **39**(1), 45–50. doi : 10.1111/nan.12017.

Georgieva, M., Krasteva, M., Angelova, E., Ralchev, K., Dimitrov, V., Bozhimirov, S., Georgieva, E. and Berger, M. R. [2008], '**Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients**', *Oncology Reports* **20**(1), 3–11. doi : 10.3892/or.20.1.3.

Gerber, Y. N., Saint-Martin, G. P., Bringuier, C. M., Bartolami, S., Goze-Bac, C., Noristani, H. N. and Perrin, F. E. [2018], '**CSF1R inhibition reduces microglia proliferation, promotes tissue preservation and improves motor recovery after spinal cord injury**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**. doi : 10.3389/fncel.2018.00368.

Giannoni, P., Arango-Lievano, M., Neves, I. D., Rousset, M.-C., Baranger, K., Rivera, S., Jeanneteau, F., Claeysen, S. and Marchi, N. [2016], '**Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease**', *Neurobiology of Disease* **88**, 107–117. doi : 10.1016/j.nbd.2016.01.001.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M. and Merad, M. [2010], '**Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages**', *Science* **330**(6005), 841–845. doi : 10.1126/science.1194637.

Glezer, I., Simard, A. R. and Rivest, S. [2007], '**Neuroprotective role of the innate immune system by microglia**'. doi : 10.1016/j.neuroscience.2007.02.055.

Gomez-Nicola, D. and Boche, D. [2015], '**Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease**', *Alzheimer's Research and Therapy* **7**(1). doi : 10.1186/s13195-015-0126-1.

Gonzalez, C., Armijo, E., Bravo-Alegria, J., Becerra-Calixto, A., Mays, C. E. and Soto, C. [2018], '**Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids**', *Molecular Psychiatry* **23**(12), 2363–2374. doi : 10.1038/s41380-018-0229-8.

Goodridge, H. S., Reyes, C. N., Becker, C. A., Katsumoto, T. R., Ma, J., Wolf, A. J., Bose, N., Chan, A. S. H., Magee, A. S., Danielson, M. E., Weiss, A., Vasilakos, J. P. and Underhill, D. M. [2011], '**Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'**', *Nature* **472**(7344), 471–475. doi : 10.1038/nature10071.

Gorlovoy, P., Larionov, S., Pham, T. T. H. and Neumann, H. [2009], '**Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators**', *The FASEB Journal* **23**(8), 2502–2513. doi : 10.1096/fj.08-123877.

Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetzki, J. C. M., Sajti, E., Jaeger, B. N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M. P., Pena, M., Adair, A., Gonda, D. D., Levy, M. L., Ransohoff, R. M., Gage, F. H. and Glass, C. K. [2017], '**An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity**', *Science* **356**(6344). doi : 10.1126/science.aal3222.

Gour, N., Lajoie, S., Smole, U., White, M., Hu, D., Goddard, P., Huntsman, S., Eng, C., Mak, A., Oh, S., Kim, J. H., Sharma, A., Plante, S., Salem, I. H., Resch, Y., Xiao, X., Yao, N., Singh, A., Vrtala, S., Chakir, J., Burchard, E. G., Lane, A. P. and Wills-Karp, M. [2018], '**Dysregulated invertebrate tropomyosin–dectin-1 interaction confers susceptibility to allergic diseases**', *Science Immunology* **3**(20). doi : 10.1126/sciimmunol.aam9841.

Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., Freeman, T. C., Summers, K. M. and McColl, B. W. [2016], '**Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging**', *Nat Neurosci* **19**(3), 504–516. doi : 10.1038/nn.4222.

Grathwohl, S. A., Kälin, R. E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S. A., Odenthal, J., Radde, R., Eldh, T., Gandy, S., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Mathews, P. M., Wolburg, H., Heppner, F. L. and Jucker, M. [2009], '**Formation and maintenance of Alzheimer's disease β-amyloid plaques in the absence of microglia**', *Nature Neuroscience* **12**(11), 1361–1363. doi : 10.1038/nn.2432.

Griffin, W. S., Sheng, J. G., Roberts, G. W. and Mrak, R. E. [1995], '**Interleukin-1 Expression in Different Plaque Types in Alzheimer's Disease : Significance in Plaque Evolution**', *J Neuropathol Exp Neurol* **54**(2), 276–81. doi : 10.1097/00005072-199503000-00014.

Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L. and Araoz, C. [1989], '**Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease.**', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(19), 7611–7615. doi : 10.1073/pnas.86.19.7611.

Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S. C. and Geijtenbeek, T. B. [2009], '**Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-κB activation through Raf-1 and Syk**', *Nature Immunology* **10**(2), 203–213. doi : 10.1038/ni.1692.

Gringhuis, S. I., Kaptein, T. M., Wevers, B. A., Theelen, B., van der Vlist, M., Boekhout, T. and Geijtenbeek, T. B. H. [2012], '**Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1β via a noncanonical caspase-8 inflammasome**', *Nature Immunology* **13**(3), 246–254. doi : 10.1038/ni.2222.

Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I. and Ruland, J. [2006], '**Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity**', *Nature* **442**(7103), 651–656. doi : 10.1038/nature04926.

Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hannesschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mocsai, A., Tschopp, J. and Ruland, J. [2009], '**Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence**', *Nature* **459**(7245), 433–436. doi : 10.1038/nature07965.

Grünebach, F., Weck, M. M., Reichert, J. and Brossart, P. [2002], '**Molecular and functional characterization of human Dectin-1**', *Experimental Hematology* **30**(11), 1309–1315. doi : 10.1016/S0301-472X(02)00928-1.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S. K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St. George-Hyslop, P., Singleton, A. and Hardy, J. [2013], '**TREM2 Variants in Alzheimer's Disease**', *New England Journal of Medicine* **368**(2), 117–127. doi : 10.1056/NEJMoa1211851.

Guneykaya, D., Ivanov, A., Hernandez, D. P., Haage, V., Wojtas, B., Meyer, N., Maricos, M., Jordan, P., Buonfiglioli, A., Gielniewski, B., Ochocka, N., Cömert, C., Friedrich, C., Artiles, L. S., Kaminska, B., Mertins, P., Beule, D., Kettenmann, H. and Wolf, S. A. [2018], '**Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains**', *Cell Reports* **24**(10), 2773–2783.e6. doi : 10.1016/J.CELREP.2018.08.001.

Guo, L., Ladu, M. J. and Van Eldik, L. J. [2004], '**A Dual Role for Apolipoprotein E in Neuroinflammation Anti-and Pro-Inflammatory Activity**', *Journal of Molecular Neuroscience* **205**.

Guo, Y., Li, X., Zhang, M., Chen, N., Wu, S., Lei, J., Wang, Z., Wang, R., Wang, J. and Liu, H. [2019], '**Age- and brain region-associated alterations of cerebral blood flow in early Alzheimer's disease assessed in AβPP SWE /PS1 ΔE9 transgenic mice using arterial spin labeling**', *Molecular Medicine Reports* **19**(4), 3045–3052. doi : 10.3892/mmr.2019.9950.

Halfon, S., Ford, J., Foster, J., Dowling, L., Lucian, L., Sterling, M., Xu, Y., Weiss, M., Ikeda, M., Liggett, D., Helms, A., Caux, C., Lebecque, S., Hannum, C., Menon, S., McClanahan, T., Gorman, D. and Zurawski, G. [1998], '**Leukocystatin, a new Class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells.**', *The Journal of biological chemistry* **273**(26), 16400–8. doi : 10.1074/jbc.273.26.16400.

Hall, C. S. [1934], '**Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality**', *Journal of Comparative Psychology* **18**(3), 385–403. doi : 10.1037/h0071444.

Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Potier, M. C., Corlier, F., Kuhnast, B., Caillé, F., Dubois, B., Fillon, L., Chupin, M., Bottlaender, M. and Sarazin, M. [2018], '**Distinct dynamic profiles of microglial activation are associated with progression of Alzheimer's disease**', *Brain* **141**(6), 1855–1870. doi : 10.1093/brain/awy079.

Hamilton, A. and Holscher, C. [2012], '**The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP swe/PS1 deltaE9 mouse model of Alzheimer's disease**', *Brain Research* **1449**, 83–93. doi : 10.1016/j.brainres.2012.02.015.

Hamilton, G., Colbert, J. D., Schuettelkopf, A. W. and Watts, C. [2008], '**Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis**', *EMBO Journal* **27**, 499–508. doi : 10.1038/sj.emboj.7601979.

Hampel, H., Caraci, F., Cuello, A. C., Caruso, G., Nisticò, R., Corbo, M., Baldacci, F., Toschi, N., Garaci, F., Chiesa, P. A., Verdooner, S. R., Akman-Anderson, L., Hernández, F., Ávila, J., Emanuele, E., Valenzuela, P. L., Lucía, A., Watling, M., Imbimbo, B. P., Vergallo, A. and Lista, S. [2020], '**A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease**', *Frontiers in Immunology* **11**. doi : 10.3389/fimmu.2020.00456.

Hanisch, U.-K. and Kettenmann, H. [2007], '**Microglia : Active Sensor and Versatile Effector Cells in the Normal and Pathologic Brain**', *Nature Neuroscience* **10**(11), 1387–94.

Hark, T. J., Rao, N. R., Castillon, C., Basta, T., Smukowski, S., Bao, H., Upadhyay, A., Bomba-Warczak, E., Nomura, T., O'Toole, E. T., Morgan, G. P., Ali, L., Saito, T., Guillermier, C., Saido, T. C., Steinhauser, M. L., Stowell, M. H., Chapman, E. R., Contractor, A. and Savas, J. N. [2021], '**Pulse-Chase Proteomics of the App Knockin Mouse Models of Alzheimer's Disease Reveals that Synaptic Dysfunction Originates in Presynaptic Terminals**', *Cell Systems* **12**, 1–18. doi : 10.1016/j.cels.2020.11.007.

Hashemiaghdam, A. and Mroczek, M. [2020], '**Microglia heterogeneity and neurodegeneration : The emerging paradigm of the role of immunity in Alzheimer's disease**', *Journal of Neuroimmunology* **341**. doi : 10.1016/j.jneuroim.2020.577185.

Hashimoto, T., Serrano-Pozo, A., Hori, Y., Adams, K. W., Takeda, S., Banerji, A. O., Mitani, A., Joyner, D., Thyssen, D. H., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L., Finn, M. B., Holtzman, D. M. and Hyman, B. T. [2012], '**Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid Peptide**', *Journal of Neuroscience* **32**(43), 15181–15192. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012.

Hatat, B., Yahiaoui, S., Lecoutey, C., Davis, A., Freret, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C. and Dallemagne, P. [2019], '**A novel in vivo anti-amnesic agent, specially designed to express both acetylcholinesterase (AChE) inhibitory, serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist and serotonergic subtype 6 receptor (5-HT6R) inverse agonist activities, with a potential inter**', *Frontiers in Aging Neuroscience* **11**(JUN). doi : 10.3389/fnagi.2019.00148.

Haure-Mirande, J. V., Wang, M., Audrain, M., Fanutza, T., Kim, S. H., Heja, S., Readhead, B., Dudley, J. T., Blitzer, R. D., Schadt, E. E., Zhang, B., Gandy, S. and Ehrlich, M. E. [2019], '**Integrative approach to sporadic Alzheimer's disease : deficiency of TYROBP in cerebral Aβ amyloidosis mouse normalizes clinical phenotype and complement subnetwork molecular pathology without reducing Aβ burden**', *Molecular Psychiatry* **24**(3), 431–446. doi : 10.1038/s41380-018-0255-6.

Hayes, A., Thaker, U., Iwatsubo, T., Pickering-Brown, S. M. and Mann, D. M. [2002], '**Pathological relationships between microglial cell activity and tau and amyloid β protein in patients with Alzheimer's disease**', *Neuroscience Letters* **331**(3), 171–174. doi : 10.1016/S0304-3940(02)00888-1.

Hazy, A., Bochicchio, L., Oliver, A., Xie, E., Geng, S., Brickler, T., Xie, H., Li, L., Allen, I. C. and Theus, M. H. [2019], '**Divergent age-dependent peripheral immune transcriptomic profile following traumatic brain injury**', *Scientific Reports* **9**(1), 1–9. doi : 10.1038/s41598-019-45089-z.

He, Y., Zheng, M. M., Ma, Y., Han, X. J., Ma, X. Q., Qu, C. Q. and Du, Y. F. [2012], '**Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β-peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response**', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **429**(3-4), 125–130. doi : 10.1016/j.bbrc.2012.10.129.

Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. and Evans, D. A. [2013], '**Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census.**', *Neurology* **80**(19), 1778–83. doi : 10.1212/WNL.0b013e31828726f5.

Hefendehl, J. K., Neher, J. J., Sühs, R. B., Kohsaka, S., Skodras, A. and Jucker, M. [2014], '**Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain**', *Aging Cell* **13**(1), 60–69. doi : 10.1111/acel.12149.

Hemonnot, A.-L., Hua, J., Ulmann, L. and Hirbec, H. [2019], '**Microglia in Alzheimer disease : Well-known targets and new opportunities**', *Frontiers in Aging Neuroscience* **9**(JUL). doi : 10.3389/fnagi.2019.00233.

Hemonnot-Girard, A.-L., Valverde, A. J., Hua, J., Delaygue, C., Linck, N., Maurice, T., Rassendren, F. and Hirbec, H. [2021], '**Analysis of CX3CR1 haplodeficiency in male and female APPswe/PSEN1dE9 mice along Alzheimer disease progression**', *Brain, Behavior, and Immunity* **91**, 404–417. doi : 10.1016/j.bbi.2020.10.021.

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. and Kummer, M. P. [2015], '**Neuroinflammation in Alzheimer's disease**'. doi : 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E. and Golenbock, D. T. [2013], '**NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice.**', *Nature* **493**(7434), 674–8. doi : 10.1038/nature11729.

Henn, A., Lund, S., Hedtjärn, M., Schrattenholz, A., Pörzgen, P. and Leist, M. [2009], '**The Suitability of BV2 Cells as Alternative Model System for Primary Microglia Cultures or for Animal Experiments Examining Brain Inflammation**', *Altex* **26**, 83–94.

Hernández-Sapiéns, M. A., Reza-Zaldívar, E. E., Cevallos, R. R., Márquez-Aguirre, A. L., Gazarian, K. and Canales-Aguirre, A. A. [2020], '**A Three-Dimensional Alzheimer's Disease Cell Culture Model Using iPSC-Derived Neurons Carrying A246E Mutation in PSEN1**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **14**, 151. doi : 10.3389/fncel.2020.00151.

Hernanz-Falcón, P., Joffre, O., Williams, D. L. and Reis e Sousa, C. [2009], '**Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses**', *European Journal of Immunology* **39**(2), 507–513. doi : 10.1002/eji.200838687.

Herre, J., Marshall, A. S. J., Caron, E., Edwards, A. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S. and Brown, G. D. [2004], '**Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages**', *Blood* **104**(13), 4038–4045. doi : 10.1182/blood-2004-03-1140.

Heywood, W. E., Galimberti, D., Bliss, E., Sirka, E., Paterson, R. W., Magdalinou, N. K., Carecchio, M., Reid, E., Heslegrave, A., Fenoglio, C., Scarpini, E., Schott, J. M., Fox, N. C., Hardy, J., Bahtia, K., Heales, S., Sebire, N. J., Zetterburg, H. and Mills, K. [2015], '**Identification of novel CSF biomarkers for neurodegeneration and their validation by a high-throughput multiplexed targeted proteomic assay**', *Molecular Neurodegeneration* **10**(1). doi : 10.1186/s13024-015-0059-y.

Hickman, S. E., Allison, E. K. and El Khoury, J. [2008], '**Microglial dysfunction and defective β-amyloid clearance pathways in aging alzheimer's disease mice**', *Journal of Neuroscience* **28**(33), 8354–8360. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.

Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K. and El Khoury, J. [2013], '**The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing**', *Nature Neuroscience* **16**(12), 1896–1905. doi : 10.1038/nn.3554.

Hirbec, H., Déglon, N., Foo, L. C., Goshen, I., Grutzendler, J., Hangen, E., Kreisel, T., Linck, N., Muffat, J., Regio, S., Rion, S. and Escartin, C. [2020], '**Emerging technologies to study glial cells**', *GLIA* **69**(2), 1–37. doi : 10.1002/glia.23780.

Hirbec, H., Marmai, C., Duroux-Richard, I., Roubert, C., Esclangon, A., Croze, S., Lachuer, J., Peyroutou, R. and Rassendren, F. [2018], '**The microglial reaction signature revealed by RNAseq from individual mice**', *GLIA* **66**(5), 971–986. doi : 10.1002/glia.23295.

Hoe, H. S., Kea, J. L., Carney, R. S., Lee, J., Markova, A., Lee, J. Y., Howell, B. W., Hyman, B. T., Pak, D. T., Bu, G. and Rebeck, G. W. [2009], '**Interaction of Reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth**', *Journal of Neuroscience* **29**(23), 7459–7473. doi : 10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009.

Hoeijmakers, L., Ruigrok, S. R., Amelianchik, A., Ivan, D., van Dam, A. M., Lucassen, P. J. and Korosi, A. [2017], '**Early-life stress lastingly alters the neuroinflammatory response to amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model**', *Brain, Behavior, and Immunity* **63**, 160–175. doi : 10.1016/j.bbi.2016.12.023.

Holtman, I. R., Skola, D. and Glass, C. K. [2017], '**Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease**', *J Clin Invest* **127**(9), 3220–3229. doi : 10.1172/JCI90604.

Hook, V., Funkelstein, L., Wegrzyn, J., Bark, S., Kindy, M. and Hook, G. [2012], '**Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides : Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease**'. doi : 10.1016/j.bbapap.2011.08.015.

Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L. L., Ashe, K. H. and Liao, D. [2010], '**Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration**', *Neuron* **68**(6), 1067–1081. doi : 10.1016/j.neuron.2010.11.030.

Horvath, R. J., Nutile-McMenemy, N., Alkaitis, M. S. and DeLeo, J. A. [2008], '**Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures**', *Journal of Neurochemistry* **107**(2), 557–569. doi : 10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x.

Hu, B. Y., Du, Z. W. and Zhang, S. C. [2009], '**Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells**', *Nature Protocols* **4**(11), 1614–1622. doi : 10.1038/nprot.2009.186.

Hu, B. Y. and Zhang, S. C. [2009], '**Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells**', *Nature Protocols* **4**(9), 1295–1304. doi : 10.1038/nprot.2009.127.

Huang, H., Nie, S., Cao, M., Marshall, C., Gao, J., Xiao, N., Hu, G. and Xiao, M. [2016], '**Characterization of AD-like phenotype in aged APPSwe/PS1dE9 mice**', *Age* **38**(4), 303–322. doi : 10.1007/s11357-016-9929-7.

Husna Ibrahim, N., Yahaya, M. F., Mohamed, W., Teoh, S. L., Hui, C. K. and Kumar, J. [2020], '**Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease : Seeking Clarity in a Time of Uncertainty**', *Frontiers in Pharmacology* **11**. doi : 10.3389/fphar.2020.00261.

Hüttenrauch, M., Ogorek, I., Klafki, H., Otto, M., Stadelmann, C., Weggen, S., Wiltfang, J. and Wirths, O. [2018], '**Glycoprotein NMB : a novel Alzheimer's disease associated marker expressed in a subset of activated microglia**', *Acta neuropathologica communications* **6**(1), 108. doi : 10.1186/s40478-018-0612-3.

Hwang, J., Estick, C. M., Ikonne, U. S., Butler, D., Pait, M. C., Elliott, L. H., Ruiz, S., Smith, K., Rentschler, K. M., Mundell, C., Almeida, M. F., Bear, N. S., Locklear, J. P., Abumohsen, Y., Ivey, C. M., Farizatto, K. L. and Bahr, B. A. [2019], '**The role of lysosomes in a broad disease-modifying approach evaluated across transgenic mouse models of Alzheimer's disease and Parkinson's disease and models of mild cognitive impairment**', *International Journal of Molecular Sciences* **20**(18). doi : 10.3390/ijms20184432.

Hyo, K. W., Ui, J. P., Soo, Y. K., Jin, H. L., Kim, S. U., Byoung, J. G. and Yong, B. L. [2008], '**Free radical production in CA1 neurons induces MIP-1α expression, microglia recruitment, and delayed neuronal death after transient forebrain ischemia**', *Journal of Neuroscience* **28**(7), 1721–1727. doi : 10.1523/JNEUROSCI.4973-07.2008.

Ii, K., Ito, H., Kominami, E. and Hirano, A. [1993], '**Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease, parkinsonism-dementia complex on Guam, and senile dementia and in the aged**', *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology* **423**(3), 185–194. doi : 10.1007/BF01614769.

Ikonomovic, M. D., Abrahamson, E. E., Price, J. C., Hamilton, R. L., Mathis, C. A., Paljug, W. R., Debnath, M. L., Cohen, A. D., Mizukami, K., DeKosky, S. T., Lopez, O. L. and Klunk, W. E. [2012], '**Early AD pathology in a [C-11]PiB-negative case : A PiB-amyloid imaging, biochemical, and immunohistochemical study**', *Acta Neuropathologica* **123**(3), 433–447. doi : 10.1007/s00401-012-0943-2.

Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E., Le, K., Aljewari, H. W., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C. and Watanabe, K. [2018], '**Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice**', *PLOS ONE* **13**(10), e0204941. doi : 10.1371/journal.pone.0204941.

Izumi, H., Shinoda, Y., Saito, T., Saido, T. C., Sato, K., Yabuki, Y., Matsumoto, Y., Kanemitsu, Y., Tomioka, Y., Abolhassani, N., Nakabeppu, Y. and Fukunaga, K. [2018], '**The Disease-modifying Drug Candidate, SAK3 Improves Cognitive Impairment and Inhibits Amyloid beta Deposition in App Knock-in Mice**', *Neuroscience* **377**, 87–97. doi : 10.1016/j.neuroscience.2018.02.031.

Izzotti, A., Pulliero, A., Orcesi, S., Cartiglia, C., Longobardi, M. G., Capra, V., Lebon, P., Cama, A., La Piana, R., Lanzi, G. and Fazzi, E. [2009], '**Interferon-Related Transcriptome Alterations in the Cerebrospinal Fluid Cells of Aicardi-Goutières Patients**', *Brain Pathology* **19**(4), 650–660. doi : 10.1111/j.1750-3639.2008.00229.x.

Janelsins, M. C., Mastrangelo, M. A., Park, K. M., Sudol, K. L., Narrow, W. C., Oddo, S., LaFerla, F. M., Callahan, L. M., Federoff, H. J. and Bowers, W. J. [2008], '**Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice**', *American Journal of Pathology* **173**(6), 1768–1782. doi : 10.2353/ajpath.2008.080528.

Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Borchelt, D. R. [2004], '**APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1**', *Neurobiology of Aging* **25**(7), 885–892. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2003.09.008.

Janota, C. S., Brites, D., Lemere, C. A. and Brito, M. A. [2015], '**Glio-vascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice**', *Brain Research* **1620**, 153–168. doi : 10.1016/j.brainres.2015.04.056.

Janssen, B. and Mach, R. H. [2019], **Development of brain PET imaging agents : Strategies for imaging neuroinflammation in Alzheimer's disease**, *in* 'Progress in Molecular Biology and Translational Science', Vol. 165, Elsevier B.V., pp. 371–399. doi : 10.1016/bs.pmbts.2019.04.005.

Janus, C., Flores, A. Y., Xu, G. and Borchelt, D. R. [2015], '**Behavioral abnormalities in APP Swe /PS1dE9 mouse model of AD-like pathology : comparative analysis across multiple behavioral domains**', *Neurobiology of Aging* **36**, 2519–2532. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.010.

Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., Xu, G., Margevicius, D., Karlo, J. C., Sousa, G. L., Cotleur, A. C., Butovsky, O., Bekris, L., Staugaitis, S. M., Leverenz, J. B., Pimplikar, S. W., Landreth, G. E., Howell, G. R., Ransohoff, R. M. and Lamb, B. T. [2015], '**TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models.**', *The Journal of experimental medicine* **212**(3), 287–95. doi : 10.1084/jem.20142322.

Jekabsone, A., Mander, P. K., Tickler, A., Sharpe, M. and Brown, G. C. [2006], '**Fibrillar beta-amyloid peptide Aβ1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-α release and H2O2 derived from NADPH oxidase : A cell culture study**', *Journal of Neuroinflammation* **3**. doi : 10.1186/1742-2094-3-24.

Jewett, A. and Tseng, H. C. [2011], '**Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function ; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells**'. doi : 10.7150/jca.2.443.

Jiang, Q., Lee, C. Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T. M., Collins, J. L., Richardson, J. C., Smith, J. D., Comery, T. A., Riddell, D., Holtzman, D. M., Tontonoz, P. and Landreth, G. E. [2008], '**ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβ**', *Neuron* **58**(5), 681–693. doi : 10.1016/j.neuron.2008.04.010.

Jiang, T., Tan, L., Zhu, X.-C., Zhang, Q.-Q., Cao, L., Tan, M.-S., Gu, L.-Z., Wang, H.-F., Ding, Z.-Z., Zhang, Y.-D. and Yu, J.-T. [2014], '**Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.**', *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **39**(13), 2949–2962. doi : 10.1038/npp.2014.164.

Jin, M., Cao, L. and Dai, Y. P. [2019], '**Role of Neurofilament Light Chain as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease : A Correlative Meta-Analysis**'. doi : 10.3389/fnagi.2019.00254.

Jin, S. C., Benitez, B. A., Karch, C. M., Cooper, B., Skorupa, T., Carrell, D., Norton, J. B., Hsu, S., Harari, O., Cai, Y., Bertelsen, S., Goate, A. M. and Cruchaga, C. [2014], '**Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease**', *Human Molecular Genetics* **23**(21), 5838–5846. doi : 10.1093/hmg/ddu277.

Joe, E. and Ringman, J. M. [2019], '**Cognitive symptoms of Alzheimer's disease : Clinical management and prevention**'. doi : 10.1136/bmj.l6217.

Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A. I., Lah, J. J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O. A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., Ikram, M. A., van Duijn, C. M., Thorsteinsdottir, U., Kong, A. and Stefansson, K. [2013], '**Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease**', *New England Journal of Medicine* **368**(2), 107–116. doi : 10.1056/NEJMoa1211103.

Jouanne, M., Rault, S. and Voisin-Chiret, A. S. [2017], '**Tau protein aggregation in Alzheimer's disease : An attractive target for the development of novel therapeutic agents**'. doi : 10.1016/j.ejmech.2017.07.070.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A. and Littman, D. R. [2000], '**Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion**', *Molecular and Cellular Biology* **20**(11), 4106–4114. doi : 10.1128/mcb.20.11.4106-4114.2000.

Kamboh, M. I. [2018], '**A Brief Synopsis on the Genetics of Alzheimer's Disease**', *Current Genetic Medicine Reports* **6**(4), 133–135. doi : 10.1007/s40142-018-0155-8.

Kankkunen, P., Teirilä, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H. and Matikainen, S. [2010], '**(1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages.**', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**(11), 6335–42. doi : 10.4049/jimmunol.0903019.

Karch, C. and Goate, A. [2016], '**Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis.**', *Biol Psychiatry* **77**(1), 43–51. doi : 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.Alzheimer.

Karch, C. M., Jeng, A. T., Nowotny, P., Cady, J., Cruchaga, C. and Goate, A. M. [2012], '**Expression of Novel Alzheimer's Disease Risk Genes in Control and Alzheimer's Disease Brains**', *PLoS ONE* **7**(11). doi : 10.1371/journal.pone.0050976.

Karumuthil-Melethil, S., Gudi, R., Johnson, B. M., Perez, N. and Vasu, C. [2014], '**Fungal β-Glucan, a Dectin-1 Ligand, Promotes Protection from Type 1 Diabetes by Inducing Regulatory Innate Immune Response**', *The Journal of Immunology* **193**(7), 3308–3321. doi : 10.4049/jimmunol.1400186.

Karumuthil-Melethil, S., Perez, N., Li, R. and Vasu, C. [2008], '**Induction of Innate Immune Response through Toll-like Receptor 2 and Dectin 1 prevents type 1 diabetes 1**', *The Journal of Immunology* **181**(12), 8323–8334. doi : 10.4049/jimmunol.181.12.8323.

Kato, G., Inada, H., Wake, H., Akiyoshi, R., Miyamoto, A., Eto, K., Ishikawa, T., Moorhouse, A. J., Strassman, A. M. and Nabekura, J. [2016], '**Microglial contact prevents excess depolarization and rescues neurons from excitotoxicity**', *eNeuro* **3**(3), 9133–9144. doi : 10.1523/ENEURO.0004-16.2016.

Katzman, R., Terry, R., Deteresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X. and Peck, A. [1988], '**Clinical, Pathological, and Neurochemical Changes in Dementia : A Subgroup with Preserved Mental Status and Numerous Neocortical Plaques**', *American Neurological Association* **23**(2), 138–144. doi : 10.1002/ana.410230206.

Kelly, P., Denver, P., Satchell, S. C., Ackermann, M., Konerding, M. A. and Mitchell, C. A. [2017], '**Microvascular ultrastructural changes precede cognitive impairment in the murine APPswe/PS1dE9 model of Alzheimer's disease**', *Angiogenesis* **20**(4), 567–580. doi : 10.1007/s10456-017-9568-3.

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M. and Amit, I. [2017], '**A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease**', *Cell* **169**(7), 1276–1290 e17. doi : 10.1016/j.cell.2017.05.018.

Ketelut-Carneiro, N., Ghosh, S., Levitz, S. M., Fitzgerald, K. A. and Da Silva, J. S. [2018], '**A Dectin-1-Caspase-8 Pathway Licenses Canonical Caspase-1 Inflammasome Activation and Interleukin-1β Release in Response to a Pathogenic Fungus**', *Journal of Infectious Diseases* **217**(2), 329–339. doi : 10.1093/infdis/jix568.

Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D. N., Luckow, B., Brocker, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F. and Prinz, M. [2013], '**Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1-and Irf8-dependent pathways**', *Nature Neuroscience* **16**(3), 273–280. doi : 10.1038/nn.3318.

Kiialainen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O. and Peltonen, L. [2005], '**Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS**', *Neurobiology of Disease* **18**(2), 314–322. doi : 10.1016/j.nbd.2004.09.007.

Kim, C. C., Nakamura, M. C. and Hsieh, C. L. [2016], '**Brain trauma elicits non-canonical macrophage activation states**', *Journal of Neuroinflammation* **13**(1). doi : 10.1186/s12974-016-0581-z.

Kim, H. and Lingler, J. H. [2019], **Disclosure of amyloid PET scan results : A systematic review**, *in* 'Progress in Molecular Biology and Translational Science', Vol. 165, Elsevier B.V., pp. 401–414. doi : 10.1016/bs.pmbts.2019.05.002.

Kimura, Y., Chihara, K., Honjoh, C., Takeuchi, K., Yamauchi, S., Yoshiki, H., Fujieda, S. and Sada, K. [2014], '**Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine secretion via spleen tyrosine kinase (Syk) in rat mast cells.**', *The Journal of biological chemistry* **289**(45), 31565–75. doi : 10.1074/jbc.M114.581322.

Koffie, R. M., Hashimoto, T., Tai, H.-C., Kay, K. R., Serrano-Pozo, A., Joyner, D., Hou, S., Kopeikina, K. J., Frosch, M. P., Lee, V. M., Holtzman, D. M., Hyman, B. T. and Spires-Jones, T. L. [2012], '**Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-β**', *Brain* **135**(7), 2155–2168. doi : 10.1093/brain/aws127.

Kos, J., Nanut, M. P., Prunk, M., Sabotič, J., Dautović, E. and Jewett, A. [2018], '**Cystatin F as a regulator of immune cell cytotoxicity**', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **67**(12), 1931–1938. doi : 10.1007/s00262-018-2165-5.

Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M. and Novak, M. [2011], '**Misfolded Truncated Protein τ Induces Innate Immune Response via MAPK Pathway**', *The Journal of Immunology* **187**(5), 2732–2739. doi : 10.4049/jimmunol.1100216.

Krasemann, S., Madore, C., Ron Cialic,1 Caroline Baufeld,1 Narghes Calcagno,1 Rachid El Fatimy, ., Lien Beckers,1 Elaine O'Loughlin,1 Yang Xu,3 Zain Fanek,1 David J. Greco,1 Scott T. Smith,1 George Tweet, ., Zachary Humulock,1 Tobias Zrzavy,4 Patricia Conde-Sanroman,5 Mar Gacias,5 Zhiping Weng,6 Hao Chen,6 Emily Tjon, ., Fargol Mazaheri,7 Kristin Hartmann,2 Asaf Madi,1 Jason D. Ulrich,8 Markus Glatzel,2 Anna Worthmann,9 Joerg Heeren, ., Bogdan Budnik,10 Cynthia Lemere,1

Tsuneya Ikezu,11 Frank L. Heppner,12,13 Vladimir Litvak,3 David M. Holtzman, ., Hans Lassmann,4 Howard L. Weiner,1,14 Jordi Ochando, ., Haass, C. and Butovsky, O. [2017], '**The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases**', *Immunity* **47**, 566 – 581. doi : 10.1016/j.immuni.2017.08.008.

Krauthausen, M., Kummer, M. P., Zimmermann, J., Reyes-Irisarri, E., Terwel, D., Bulic, B., Heneka, M. T. and Müller, M. [2015], '**CXCR3 promotes plaque formation and behavioral deficits in an Alzheimer's disease model**', *Journal of Clinical Investigation* **125**(1), 365–378. doi : 10.1172/JCI66771.

Krencik, R., Weick, J. P., Liu, Y., Zhang, Z. J. and Zhang, S. C. [2011], '**Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells**', *Nature Biotechnology* **29**(6), 528–534. doi : 10.1038/nbt.1877.

Kroner, A. and Rosas Almanza, J. [2019], '**Role of microglia in spinal cord injury**', *Neuroscience Letters* **709**. doi : 10.1016/j.neulet.2019.134370.

Lalonde, R., Kim, H. D. and Fukuchi, K. [2004], '**Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APPswe + PS1/ΔE9 mice**', *Neuroscience Letters* **369**(2), 156–161. doi : 10.1016/j.neulet.2004.07.069.

Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., DeStefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., Vardarajan, B. N., Kamatani, Y., Lin, C. F., Gerrish, A., Schmidt, H., Kunkle, B., Fiévet, N., Amouyel, P., Pasquier, F., Deramecourt, V., De Bruijn, R. F., Amin, N., Hofman, A., Van Duijn, C. M., Dunstan, M. L., Hollingworth, P., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Jones, L., Holmans, P. A., Moskvina, V., Williams, J., Baldwin, C., Farrer, L. A., Choi, S. H., Lunetta, K. L., Fitzpatrick, A. L., Harris, T. B., Psaty, B. M., Gilbert, J. R., Hamilton-Nelson, K. L., Martin, E. R., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Gudnason, V., Jonsson, P. V., Eiriksdottir, G., Bihoreau, M. T., Lathrop, M., Valladares, O., Cantwell, L. B., Wang, L. S., Schellenberg, G. D., Ruiz, A., Boada, M., Reitz, C., Mayeux, R., Ramirez, A., Maier, W., Hanon, O., Kukull, W. A., Buxbaum, J. D., Campion, D., Wallon, D., Hannequin, D., Crane, P. K., Larson, E. B., Becker, T., Cruchaga, C., Goate, A. M., Craig, D., Johnston, J. A., Mc-Guinness, B., Todd, S., Passmore, P., Berr, C., Ritchie, K., Lopez, O. L., De Jager, P. L., Evans, D., Lovestone, S., Proitsi, P., Powell, J. F., Letenneur, L., Barberger-Gateau, P., Dufouil, C., Dartigues, J. F., Morón, F. J., Rubinsztein, D. C., St. George-Hyslop, P., Sleegers, K., Bettens, K., Van Broeckhoven, C., Huentelman, M. J., Gill, M., Brown, K., Morgan, K., Kamboh, M. I., Keller, L., Fratiglioni, L., Green, R., Myers, A. J., Love, S., Rogaeva, E., Gallacher, J., Bayer, A., Clarimon, J., Lleo, A., Tsuang, D. W., Yu, L., Bennett, D. A., Tsolaki, M., Bossù, P., Spalletta, G., Collinge, J., Mead, S., Sorbi, S., Nacmias, B., Sanchez-Garcia, F., Deniz Naranjo, M. C., Fox, N. C., Hardy, J., Bosco, P., Clarke, R., Brayne, C., Galimberti, D., Mancuso, M., Matthews, F., Moebus, S., Mecocci, P., Del Zompo, M., Hampel, H., Pilotto, A., Bullido, M., Panza, F., Caffarra, P., Mayhaus, M., Pichler, S., Gu, W., Riemenschneider, M., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Hakonarson, H., Carrasquillo, M. M., Zou, F., Younkin, S. G., Beekly, D., Alvarez, V., Coto, E., Razquin, C., Pastor, P., Mateo, I., Combarros, O., Faber, K. M., Foroud, T. M., Soininen, H., Hiltunen, M., Blacker, D., Mosley, T. H., Graff, C., Holmes, C., Montine, T. J., Rotter, J. I., Brice, A., Nalls, M. A., Kauwe, J. S., Boerwinkle, E., Schmidt, R., Rujescu, D., Tzourio, C., Nöthen, M. M., Launer, L. J. and Seshadri, S. [2013], '**Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease**', *Nature Genetics* **45**(12), 1452–1458. doi : 10.1038/ng.2802.

Lane, C. A., Hardy, J. and Schott, J. M. [2017], '**Alzheimer's disease**', *European Journal of Neurology* **25**(1), 59–70. doi : 10.1111/ene.13439.

Langerholc, T., Zavašnik-Bergant, V., Turk, B., Turk, V., Abrahamson, M. and Kos, J. [2005], '**Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells**', *FEBS Journal* **272**(6), 1535–1545. doi : 10.1111/j.1742-4658.2005.04594.x.

Laurent, C., Buée, L. and Blum, D. [2018], '**Tau and neuroinflammation : What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies ?**', *Biomedical Journal* **41**(1), 21–33. doi : 10.1016/j.bj.2018.01.003.

Laurent, C., Dorothée, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., Dong, Y., Légeron, F. P., Leboucher, A., Burnouf, S., Faivre, E., Carvalho, K., Caillierez, R., Zommer, N., Demeyer, D., Jouy, N., Sazdovitch, V., Schraen-Maschke, S., Delarasse, C., Buée, L. and Blum, D. [2017], '**Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy**', *Brain* **140**(1), 184–200. doi : 10.1093/brain/aww270.

Lavisse, S., Guillermier, M., Hérard, A. S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N. V., Haim, L. B., Lebon, V., Remy, P., Dollé, F., Delzescaux, T., Bonvento, G., Hantraye, P. and Escartin, C. [2012], '**Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging**', *Journal of Neuroscience* **32**(32), 10809–10818. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1487-12.2012.

Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P. and Gordon, S. [1990], '**Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain**', *Neuroscience* **39**(1), 151–170. doi : 10.1016/0306-4522(90)90229-W.

Lawson, L. J., Perry, V. H. and Gordon˜, S. [1992], '**Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain**', *Neuroscience* **48**(2), 405415. doi : 10.1016/0306-4522(92)90500-2.

Lech, M., Susanti, H. E., Römmele, C., Gröbmayr, R., Günthner, R. and Anders, H. J. [2012], '**Quantitative expression of C-Type lectin receptors in humans and mice**', *International Journal of Molecular Sciences* **13**(8), 10113–10131. doi : 10.3390/ijms130810113.

Ledig, C., Schuh, A., Guerrero, R., Heckemann, R. A. and Rueckert, D. [2018], '**Structural brain imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment : biomarker analysis and shared morphometry database**', *Scientific Reports* **8**(1). doi : 10.1038/s41598-018-29295-9.

Lee, C. Y. and Landreth, G. E. [2010], '**The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain**'. doi : 10.1007/s00702-010-0433-4.

Lee, J., Kim, D. E., Griffin, P., Sheehan, P. W., Kim, D. H., Musiek, E. S. and Yoon, S. Y. [2020], '**Inhibition of REV-ERBs stimulates microglial amyloid-beta clearance and reduces amyloid plaque deposition in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease**', *Aging Cell* **19**(2). doi : 10.1111/acel.13078.

Lehmann, S., Delaby, C., Touchon, J., Hirtz, C. and Gabelle, A. [2013], '**Biomarkers of Alzheimer's disease : The present and the future**', *Revue Neurologique* **169**(10), 719–723. doi : 10.1016/j.neurol.2013.07.012.

Leza, J. C., Bueno, B., Bioque, M., Arango, C., Parellada, M., Do, K., O'Donnell, P. and Bernardo, M. [2015], '**Inflammation in schizophrenia : A question of balance**', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **55**, 612–626. doi : 10.1016/j.neubiorev.2015.05.014.

Li, C., Zhao, G. Q., Che, C. Y., Li, N., Lin, J., Xu, Q., Wang, Q., Liu, Y. and Qiu, S. [2013], '**Expression of dectin-1 during fungus infection in human corneal epithelial cells**', *International Journal of Ophthalmology* **7**(1), 34–37. doi : 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.01.06.

Li, W., Yan, J. and Yu, Y. [2019], '**Geometrical reorganization of Dectin-1 and TLR2 on single phagosomes alters their synergistic immune signaling**', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**(50), 25106–25114. doi : 10.1073/pnas.1909870116.

Li, X., Feng, Y., Wu, W., Zhao, J., Fu, C., Li, Y., Ding, Y., Wu, B., Gong, Y., Yang, G. and Zhou, X. [2016], '**Sex differences between APPswePS1dE9 mice in A-beta accumulation and pancreatic islet function during the development of Alzheimer's disease**', *Laboratory Animals* **50**(4), 275–285. doi : 10.1177/0023677215615269.

Li, Y., Liu, L., Barger, S. W., Sue, W. and Griffin, T. [2003], '**Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway**', *The Journal of Neuroscience* **23**(5), 1605–1611.

Liang, J., Li, N., Zhang, Y., Hou, C., Yang, X., Shimizu, T., Wang, X., Ikenaka, K., Fan, K. and Ma, J. [2016], '**Disinhibition of cathepsin C caused by cystatin F deficiency aggravates the demyelination in a cuprizone model**', *Frontiers in Molecular Neuroscience* **9**(DEC2016). doi : 10.3389/fnmol.2016.00152.

Linard, M., Letenneur, L., Garrigue, I., Doize, A., Dartigues, J.-F. and Helmer, C. [2020], '**Interaction between APOE4 and herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease**', *Alzheimer's & Dementia* **16**(1), 200–208. doi : 10.1002/alz.12008.

Lindestam Arlehamn, C. S., Garretti, F., Sulzer, D. and Sette, A. [2019], '**Roles for the adaptive immune system in Parkinson's and Alzheimer's diseases**', *Curr Opin Immunol* **59**, 115–120. doi : 10.1016/j.coi.2019.07.004.

Lindwall, G. and David Cole, R. [1984], '**Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly**', *The Journal of Biological Chemistry* **259**(8), 5301–5305.

Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A. J., Penke, B., Rübe, C. E., Walter, J., Heneka, M. T., Hartmann, T., Menger, M. D. and Fassbender, K. [2012], '**TLR2 Is a Primary Receptor for Alzheimer's Amyloid β Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation**', *The Journal of Immunology* **188**(3), 1098–1107. doi : 10.4049/jimmunol.1101121.

Lively, S. and Schlichter, L. C. [2018], '**Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFNγ+TNFα) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10)**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**. doi : 10.3389/fncel.2018.00215.

Lleó, A., Alcolea, D., Martínez-Lage, P., Scheltens, P., Parnetti, L., Poirier, J., Simonsen, A. H., Verbeek, M. M., Rosa-Neto, P., Slot, R. E., Tainta, M., Izaguirre, A., Reijs, B. L., Farotti, L., Tsolaki, M., Vandenbergue, R., Freund-Levi, Y., Verhey, F. R., Clarimón, J., Fortea, J., Frolich, L., Santana, I., Molinuevo, J. L., Lehmann, S., Visser, P. J., Teunissen, C. E., Zetterberg, H. and Blennow, K. [2019], '**Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker trajectories along the Alzheimer's disease continuum in the BIOMARKAPD study**', *Alzheimer's and Dementia* **15**(6), 742–753. doi : 10.1016/j.jalz.2019.01.015.

Lotz, G. P. and Legleiter, J. [2013], '**The role of amyloidogenic protein oligomerization in neurodegenerative disease**', *Journal of Molecular Medicine* **91**(6), 653–664. doi : 10.1007/s00109-013-1025-1.

Loures, F. V., Araújo, E. F., Feriotti, C., Bazan, S. B. and Calich, V. L. [2015], '**TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by Paracoccidioides brasiliensis stimulated dendritic cells**', *Frontiers in Microbiology* **6**(MAR). doi : 10.3389/fmicb.2015.00261.

Ma, J., Tanaka, K. F., Shimizu, T., Bernard, C. C. A., Kakita, A., Takahashi, H., Pfeiffer, S. E. and Ikenaka, K. [2011], '**Microglial cystatin F expression is a sensitive indicator for ongoing demyelination with concurrent remyelination**', *Journal of Neuroscience Research* **89**, 639–649. doi : 10.1002/jnr.22567.

Ma, L., Ouyang, Q., Werthmann, G. C., Thompson, H. M. and Morrow, E. M. [2017], '**Live-cell microscopy and fluorescence-based measurement of luminal pH in intracellular organelles**', *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**(AUG). doi : 10.3389/fcell.2017.00071.

Magister, Š. and Kos, J. [2013], '**Cystatins in immune system**', *Journal of Cancer* **4**(1), 45–56. doi : 10.7150/jca.5044.

Magister, Š., Obermajer, N., Mirković, B., Švajger, U., Renko, M., Softić, A., Romih, R., Colbert, J. D., Watts, C. and Kos, J. [2012], '**Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells**', *European Journal of Cell Biology* **91**(5), 391–401. doi : 10.1016/j.ejcb.2012.01.001.

Magister, Š., Tseng, H.-C., Bui, V. T., Kos, J. and Jewett, A. [2015], '**Regulation of split anergy in natural killer cells by inhibition of cathepsins C and H and cystatin F**', *Oncotraget* **6**(26).

Maher, K., Konjar, S., Watts, C., Turk, B. and Kopitar-Jerala, N. [2014], '**Cystatin F Regulates Proteinase Activity in IL-2-activated Natural Killer Cells**', *Protein & Peptide Letters* **21**(9), 957–965. doi : 10.2174/09298665216661404031241 46.

Mandrekar, S., Jiang, Q., Lee, C. Y., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D. M. and Landreth, G. E. [2009], '**Microglia mediate the clearance of soluble aβ through fluid phase macropinocytosis**', *Journal of Neuroscience* **29**(13), 4252–4262. doi : 10.1523/JNEUROSCI.5572-08.2009.

Maneu, V., Yáñez, A., Murciano, C., Molina, A., Gil, M. L. and Gozalbo, D. [2011], '**Dectin-1 mediates in vitro phagocytosis of Candida albicans yeast cells by retinal microglia : Figure 1**', *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **63**(1), 148–150. doi : 10.1111/j.1574-695X.2011.00829.x.

Mantegazza, A. R., Barrio, M. M., Moutel, S., Bover, L., Weck, M., Brossart, P., Teillaud, J. L. and Mordoh, J. [2004], '**CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells**', *Blood* **104**(4), 1183–1190. doi : 10.1182/blood-2004-01-0104.

Masuda, A., Kobayashi, Y., Kogo, N., Saito, T., Saido, T. C. and Itohara, S. [2016], '**Cognitive deficits in single App knock-in mouse models**', *Neurobiology of Learning and Memory* **135**, 73–82. doi : 10.1016/j.nlm.2016.07.001.

Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Bottcher, C., Amann, L., Scheiwe, C., Nessler, S., Kunz, P., van Loo, G., Coenen, V. A., Reinacher, P. C., Michel, A., Sure, U., Gold, R., Priller, J., Stadelmann, C. and Prinz, M. [2019], '**Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution**', *Nature* **566**(7744), 388–392. doi : 10.1038/s41586-019-0924-x.

Mathys, H., Adaikkan, C., Gao, F., Young, J. Z., Manet, E., Hemberg, M., De Jager, P. L., Ransohoff, R. M., Regev, A. and Tsai, L. H. [2017], '**Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution**', *Cell Reports* **21**(2), 366–380. doi : 10.1016/j.celrep.2017.09.039.

Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., Martorell, A. J., Ransohoff, R. M., Hafler, B. P., Bennett, D. A., Kellis, M. and Tsai, L. H. [2019], '**Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease**', *Nature* **570**(7761), 332–337. doi : 10.1038/s41586-019-1195-2.

Melief, J., Koning, N., Schuurman, K. G., Van De Garde, M. D. B., Smolders, J., Hoek, R. M., Van Eijk, M., Hamann, J. and Huitinga, I. [2012], '**Phenotyping primary human microglia : Tight regulation of LPS responsiveness**', *GLIA* **60**(10), 1506–1517. doi : 10.1002/glia.22370.

Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A. L., Vigouret, J.-M., Paganetti, P., Walsh, D. M., Mathews, P. M., Ghiso, J., Staufenbiel, M. and Walker, L. C. [2006], '**Exogenous Induction of Cerebral b-Amyloidogenesis Is Governed by Agent and Host**', *Science* **313**(5794), 1781–1784. doi : 10.1126/science.1131864.

Meyer-Wentrup, F., Figdor, C. G., Ansems, M., Brossart, P., Wright, M. D., Adema, G. J. and van Spriel, A. B. [2007], '**Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production.**', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**(1), 154–62. doi : 10.4049/JIMMUNOL.178.1.154.

Mhatre, S. D., Tsai, C. A., Rubin, A. J., James, M. L. and Andreasson, K. I. [2015], '**Microglial Malfunction : The Third Rail in the Development of Alzheimer's Disease**', *Trends in Neurosciences* **38**(10), 621–636. doi : 10.1016/j.tins.2015.08.006.

Mildner, A., Schlevogt, B., Kierdorf, K., Böttcher, C., Erny, D., Kummer, M. P., Quinn, M., Brück, W., Bechmann, I., Heneka, M. T., Priller, J. and Prinz, M. [2011], '**Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease**', *Journal of Neuroscience* **31**(31), 11159–11171. doi : 10.1523/JNEUROSCI.6209-10.2011.

Miller, A. H. and Raison, C. L. [2015], '**Are anti-inflammatory therapies viable treatments for psychiatric disorders ? Where the rubber meets the road**'. doi : 10.1001/jamapsychiatry.2015.22.

Mills Ko, E., Ma, J. H., Guo, F., Miers, L., Lee, E., Bannerman, P., Burns, T., Ko, D., Sohn, J., Soulika, A. M. and Pleasure, D. [2014], '**Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model**', *Journal of Neuroinflammation* **11**. doi : 10.1186/1742-2094-11-105.

Minett, T., Classey, J., Matthews, F. E., Fahrenhold, M., Taga, M., Brayne, C., Ince, P. G., Nicoll, J. A. R. and Boche, D. [2016], '**Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology**', *Journal of Neuroinflammation* **13**(1), 135. doi : 10.1186/s12974-016-0601-z.

Morita, M., Hara, Y., Tamai, Y., Arakawa, H. and Nishimura, S. [2000], '**Genomic construct and mapping of the gene for CMAP (leukocystatin/cystatin F, CST7) and identification of a proximal novel gene, BSCv (C20orf3)**', *Genomics* **67**(1), 87–91. doi : 10.1006/geno.2000.6237.

Mosher, K. I. and Wyss-Coray, T. [2014], '**Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease**', *Biochemical Pharmacology* **88**, 594–604. doi : 10.1016/j.bcp.2014.01.008.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K. and McConlogue, L. [2000], '**High-level neuronal expression of Aβ(1-42) in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice : Synaptotoxicity without plaque formation**', *Journal of Neuroscience* **20**(11), 4050–4058. doi : 10.1523/jneurosci.20-11-04050.2000.

Muddapu, V. R., Dharshini, S. A. P., Chakravarthy, V. S. and Gromiha, M. M. [2020], '**Neurodegenerative Diseases – Is Metabolic Deficiency the Root Cause ?**', *Frontiers in Neuroscience* **14**. doi : 10.3389/fnins.2020.00213.

Mullane, K. and Williams, M. [2020], '**Alzheimer's disease beyond amyloid : can the repetitive failures of amyloid-targeted therapeutics inform future approaches to dementia drug discovery ?**', *Biochemical Pharmacology* **177**, 113945. doi : 10.1016/j.bcp.2020.113945.

Nakazono, T., Lam, T. N., Patel, A. Y., Kitazawa, M., Saito, T., Saido, T. C. and Igarashi, K. M. [2017], '**Impaired in vivo gamma oscillations in the medial entorhinal cortex of knock-in Alzheimer model**', *Frontiers in Systems Neuroscience* **11**. doi : 10.3389/fnsys.2017.00048.

Naseri, N. N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M. and Luo, W. [2019], '**The complexity of tau in Alzheimer's disease**'. doi : 10.1016/j.neulet.2019.04.022.

Naslund Jan, Thyberg, J., Wernstedt, C., Ft Karlstrom, A., Bogdanovic, N., Samuel Gandy, I. E., Lannfelt, L., Lars Terenius, L. and Nordstedt, C. [1995], '**Characterization of Stable Complexes Involving Apolipoprotein E and the Amyloid B Peptide in Alzheimer's Disease Brain**', *Neuron* **15**, 219–228.

Nathanson, C. M., Wassélius, J., Wallin, H. and Abrahamson, M. [2002], '**Regulated expression and intracellular localization of cystatin F in human U937 cells**', *European Journal of Biochemistry* **269**(22), 5502–5511. doi : 10.1046/j.1432-1033.2002.03252.x.

Nelson, L. H., Warden, S. and Lenz, K. M. [2017], '**Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus.**', *Brain, behavior, and immunity* **64**, 11–22. doi : 10.1016/j.bbi.2017.03.010.

Nelson, P. T., Jicha, G. A., Schmitt, F. A., Liu, H., Davis, D. G., Mendiondo, M. S., Abner, E. L. and Markesbery, W. R. [2007], '**Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort : Neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity**', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **66**(12), 1136–1146. doi : 10.1097/nen.0b013e31815c5efb.

Ni, J., Fernandez, M. A., Danielsson, L., Chillakuru, R. A., Zhang, J., Grubb, A., Su, J., Gentz, R. and Abrahamson, M. [1998], '**Cystatin F Is a Glycosylated Human Low Molecular Weight Cysteine Proteinase Inhibitor**', *The Journal of Biochemistry* **273**(38), 24797 – 24804. doi : 10.1074/jbc.273.38.24797.

Nilson, A. N., English, K. C., Gerson, J. E., Barton Whittle, T., Nicolas Crain, C., Xue, J., Sengupta, U., Castillo-Carranza, D. L., Zhang, W., Gupta, P. and Kayed, R. [2017], '**Tau oligomers associate with inflammation in the brain and retina of tauopathy mice and in neurodegenerative diseases**', *Journal of Alzheimer's Disease* **55**(3), 1083–1099. doi : 10.3233/JAD-160912.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. [2005], '**Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.**', *Science* **308**(5726), 1314–1318. doi : 10.1126/science.1107891.

Nixon, R. A. [2017], '**Amyloid precursor protein & endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease : Inseparable partners in a multifactorial disease**', *FASEB Journal* **31**(7), 2729–2743. doi : 10.1096/fj.201700359.

Nordengen, K., Kirsebom, B. E., Henjum, K., Selnes, P., Gísladóttir, B., Wettergreen, M., Torsetnes, S. B., Grøntvedt, G. R., Waterloo, K. K., Aarsland, D., Nilsson, L. N. and Fladby, T. [2019], '**Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum**', *Journal of Neuroinflammation* **16**(1). doi : 10.1186/s12974-019-1399-2.

Nuvolone, M., Schmid, N., Miele, G., Sorce, S., Moos, R., Schori, C., Beerli, R. R., Bauer, M., Saudan, P., Dietmeier, K., Lachmann, I., Linnebank, M., Martin, R., Kallweit, U., Kana, V., Rushing, E. J., Budka, H. and Aguzzi, A. [2017], '**Cystatin F is a biomarker of prion pathogenesis in mice**', *PLos One* **12**(2). doi : 10.1371/journal.pone.0171923.

Ochieng, J. and Chaudhuri, G. [2010], '**Cystatin Superfamily**', *Journal of Health Care for the Poor and Underserved* **21**(1A), 51–70. doi : 10.1353/hpu.0.0257.

Ofengeim, D., Mazzitelli, S., Ito, Y., Dewitt, J. P., Mifflin, L., Zou, C., Das, S., Adiconis, X., Chen, H., Zhu, H., Kelliher, M. A., Levin, J. Z., Yuan, J., Hardwick, J. M. and Rubinsztein, D. [2017], '**RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease**', *PNAS* **114**(41), E8788–E8797. doi : 10.1073/pnas.1714175114.

Öhman, T., Teirilä, L., Lahesmaa-Korpinen, A.-M., Cypryk, W., Veckman, V., Saijo, S., Wolff, H., Hautaniemi, S., Nyman, T. A. and Matikainen, S. [2014], '**Dectin-1 Pathway Activates Robust Autophagy-Dependent Unconventional Protein Secretion in Human Macrophages**', *The Journal of Immunology* **192**(12), 5952–5962. doi : 10.4049/jimmunol.1303213.

Ojala, J. O., Sutinen, E. M., Salminen, A. and Pirttilä, T. [2008], '**Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells**', *Journal of Neuroimmunology* **205**(1-2), 86–93. doi : 10.1016/j.jneuroim.2008.09.012.

Orihuela, R., McPherson, C. A. and Harry, G. J. [2016], '**Microglial M1/M2 polarization and metabolic states**'. doi : 10.1111/bph.13139.

Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K. and Hol, E. M. [2014], '**Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation anddysfunction**', *Neurobiology of Aging* **35**(12), 2746–2760. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004.

Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D. and Gross, C. T. [2011], '**Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development**', *Science* **333**(6048), 1456–1458. doi : 10.1126/science.1202529.

Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R. and Gan, W. B. [2013], '**Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor**', *Cell* **155**(7), 1596–1609. doi : 10.1016/j.cell.2013.11.030.

Patidar, A., Mahanty, T., Raybarman, C., Sarode, A. Y., Basak, S., Saha, B. and Bhattacharjee, S. [2020], '**Barley beta-Glucan and Zymosan induce Dectin-1 and Toll-like receptor 2 co-localization and anti-leishmanial immune response in Leishmania donovani-infected BALB/c mice**', *Scandinavian Journal of Immunology* **92**(6). doi : 10.1111/sji.12952.

Pedrini, S., Gupta, V. B., Hone, E., Doecke, J., O'Bryant, S., James, I., Bush, A. I., Rowe, C. C., Villemagne, V. L., Ames, D., Masters, C. L., Martins, R. N., Savage, G., Wilson, B., Bourgeat, P., Fripp, J., Gibson, S., Leroux, H., McBride, S., Salvado, O., Fenech, M., Francois, M., Barnes, M., Baker, J., Barnham, K., Bellingham, S., Bomke, J., Pejoska, S. B., Buckley, R., Cheng, L., Collins, S., Cooke, I., Cyarto, E., Darby, D., Dore, V., El-Sheikh, D., Faux, N., Fowler, C., Harrington, K., Hill, A., Horne, M., Jones, G., Kamer, A., Killeen, N., Korrel, H., Lamb, F., Lautenschlager, N., Lennon, K., Li, Q. X., Lim, Y. Y., Louey, A., Macaulay, L., Mackintosh, L., Maruff, P., McIlroy, A., Nigro, J., Perez, K., Pertile, K., Restrepo, C., Cardoso, B. R., Rembach, A., Roberts, B., Robertson, J., Rumble, R., Ryan, T., Sach, J., Silbert, B., Thai, C., Trounson, B., Volitakis, I., Vovos, M., Ward, L., Watt, A., Williams, R., Woodward, M., Yates, P., Ugarte, F. Y., Zhang, P., Bird, S., Brown, B., Burnham, S., Chatterjee, P., Cox, K., Fernandez, S., Fernando, B., Gardener, S., Laws, S., Lim, F., Lim, L., Tegg, M., Lucas, K., Martins, G., Porter, T., Rainey-Smith, S., Rodrigues, M., Shen, K., Sohrabi, H., Taddei, K., Taddei, T., Tan, S., Verdile, G., Weinborn, M., Farrow, M., Frost, S., Hanson, D., Hor, M., Kanagasingam, Y., Leifert, W., Lockett, L., Riley, M., Saunders, I. and Thomas, P. [2017], '**A blood-based biomarker panel indicates IL-10 and IL-12/23p40 are jointly associated as predictors of β-amyloid load in an AD cohort**', *Scientific Reports* **7**(1). doi : 10.1038/s41598-017-14020-9.

Pellagatti, A., Vetrie, D., Langford, C. F., Gama, S., Eagleton, H., Wainscoat, J. S. and Boultwood, J. [2003], '**Gene Expression Profiling in Polycythemia Vera Using cDNA Microarray Technology 1**', *Cancer Research* **63**, 3940–3944. doi : 10.2177/jsci.36.27.

Penney, J., Ralvenius, W. T. and Tsai, L. H. [2020], '**Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells**', *Molecular Psychiatry* **25**(1), 148–167. doi : 10.1038/s41380-019-0468-3.

Perišić Nanut, M., Sabotič, J., Švajger, U., Jewett, A. and Kos, J. [2017], '**Cystatin F Affects Natural Killer Cell Cytotoxicity.**', *Frontiers in immunology* **8**, 1459. doi : 10.3389/fimmu.2017.01459.

Perkins, A. E., Piazza, M. K. and Deak, T. [2018], '**Stereological Analysis of Microglia in Aged Male and Female Fischer 344 Rats in Socially Relevant Brain Regions**', *Neuroscience* **377**, 40–52. doi : 10.1016/j.neuroscience.2018.02.028.

Persson, M., Brantefjord, M., Hansson, E. and Rönnbäck, L. [2005], '**Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-α**', *GLIA* **51**(2), 111–120. doi : 10.1002/glia.20191.

Petrache, A. L., Rajulawalla, A., Shi, A., Wetzel, A., Saito, T., Saido, T. C., Harvey, K. and Ali, A. B. [2019], '**Aberrant Excitatory-Inhibitory Synaptic Mechanisms in Entorhinal Cortex Microcircuits during the Pathogenesis of Alzheimer's Disease**', *Cerebral Cortex* **29**(4), 1–17. doi : 10.1093/cercor/bhz016.

Petrelli, F., Pucci, L. and Bezzi, P. [2016], '**Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders**', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **10**(FEB). doi : 10.3389/fncel.2016.00021.

Piccio, L., Buonsanti, C., Mariani, M., Cella, M., Gilfillan, S., Cross, A. H., Colonna, M. and Panina-Bordignon, P. [2007], '**Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis**', *European Journal of Immunology* **37**(5), 1290–1301. doi : 10.1002/eji.200636837.

Pisa, D., Alonso, R., Juarranz, A., Rábano, A. and Carrasco, L. [2015], '**Direct visualization of fungal infection in brains from patients with Alzheimer's disease**', *Journal of Alzheimer's Disease* **43**(2), 613–624. doi : 10.3233/JAD-141386.

Plescher, M., Seifert, G., Hansen, J. N., Bedner, P., Steinhäuser, C. and Halle, A. [2018], '**Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model**', *Glia* **66**(7), 1464–1480. doi : 10.1002/glia.23318.

Poliani, P. L., Wang, Y., Fontana, E., Robinette, M. L., Yamanishi, Y., Gilfillan, S. and Colonna, M. [2015], '**TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination**', *Journal of Clinical Investigation* **125**(5), 2161–2170. doi : 10.1172/JCI77983.

Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M. and Bessis, A. [2014], '**Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation : Functional impact of prenatal inflammation**', *European Journal of Neuroscience* **39**(10), 1551–1557. doi : 10.1111/ejn.12508.

Pradeepkiran, J. A., Reddy, A. P. and Reddy, P. H. [2019], '**Pharmacophore-based models for therapeutic drugs against phosphorylated tau in Alzheimer's disease**'. doi : 10.1016/j.drudis.2018.11.005.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A. and Herms, J. [2006], '**Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein.**', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(27), 7212–7221. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006.

Prunk, M., Nanut, M. P., Sabotic, J., Svajger, U. and Kos, J. [2019], '**Increased cystatin F levels correlate with decreased cytotoxicity of cytotoxic T cells**', *Radiology and Oncology* **53**(1), 57–68. doi : 10.2478/raon-2019-0007.

Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B. and Selkoe, D. J. [1998], '**Insulin-degrading Enzyme Regulates Extracellular Levels of Amyloid-Protein by Degradation***', *Journal of Biological Chemistry* **273**(49), 32730–32738.

Quarta, A., Le Blon, D., D'aes, T., Pieters, Z., Hamzei Taj, S., Miró-Mur, F., Luyckx, E., Van Breedam, E., Daans, J., Goossens, H., Dewilde, S., Hens, N., Pasque, V., Planas, A. M., Hoehn, M., Berneman, Z. and Ponsaerts, P. [2019], '**Murine iPSC-derived microglia and macrophage cell culture models recapitulate distinct phenotypical and functional properties of classical and alternative neuro-immune polarisation**', *Brain, Behavior, and Immunity* **82**, 406–421. doi : 10.1016/j.bbi.2019.09.009.

Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C. and Maccioni, R. B. [2004], '**Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway**', *Experimental Cell Research* **295**(1), 245–257. doi : 10.1016/j.yexcr.2004.01.002.

Raja, W. K., Mungenast, A. E., Lin, Y. T., Ko, T., Abdurrob, F., Seo, J. and Tsai, L. H. [2016], '**Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes**', *PLoS ONE* **11**(9). doi : 10.1371/journal.pone.0161969.

Rajendran, L. and Paolicelli, R. C. [2018], '**Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease.**', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **38**(12), 2911–2919. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1136-17.2017.

Ramírez-Lugo, L., Jensen, M. S., Søderman, A. and West, M. J. [2009], '**Deficits in aversive but not in safe taste memory in the APPswe/PS1dE9 mice**', *Journal of Alzheimer's Disease* **18**(2), 281–293. doi : 10.3233/JAD-2009-1141.

Ran, H., Yuan, J., Huang, J., Wang, J., Chen, K. and Zhou, Z. [2020], '**Adenosine A2A Receptors in Bone Marrow-Derived Cells Attenuate Cognitive Impairment in Mice After Chronic Hypoperfusion White Matter Injury**', *Translational Stroke Research* **11**(5), 1028–1040. doi : 10.1007/s12975-019-00778-9.

Ransohoff, R. M. [2016], '**A polarizing question : Do M1 and M2 microglia exist**', *Nature Neuroscience* **19**(8), 987–991. doi : 10.1038/nn.4338.

Reid, D. M., Montoya, M., Taylor, P. R., Borrow, P., Gordon, S., Brown, G. D. and Wong, S. Y. C. [2004], '**Expression of the β-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions**', *Journal of Leukocyte Biology* **76**(1), 86–94. doi : 10.1189/jlb.0104031.

Reiserer, R. S., Harrison, F. E., Syverud, D. C. and McDonald, M. P. [2007], '**Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1ΔE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease**', *Genes, Brain and Behavior* **6**(1), 54–65. doi : 10.1111/j.1601-183X.2006.00221.x.

Ren, A., Li, Z., Zhang, X., Deng, R. and Ma, Y. [2021], '**Inhibition of dectin-1 on dendritic cells prevents maturation and prolongs murine islet allograft survival**', *Journal of Inflammation Research* **14**, 63–73. doi : 10.2147/JIR.S287453.

Réu, P., Khosravi, A., Bernard, S., Mold, J. E., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H. and Frisén, J. [2017], '**The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain**', *Cell Reports* **20**(4), 779–784. doi : 10.1016/j.celrep.2017.07.004.

Rio-Hortega, D. P. [1919], '**El tercer elemento de los centros nerviosos.**', *Boll.Socieded Esp.Biol.* **9**, 69–120.

Rius-Pérez, S., Tormos, A., Pérez, S. and Taléns-Visconti, R. [2018], '**Vascular pathology : Cause or effect in Alzheimer disease ?**', *Neurología (English Edition)* **33**(2), 112–120. doi : 10.1016/j.nrleng.2015.07.008.

Rodriguez, G. A., Tai, L. M., LaDu, M. J. and Rebeck, G. W. [2014], '**Human APOE4 increases microglia reactivity at Aβ plaques in a mouse model of Aβ deposition.**', *Journal of neuroinflammation* **11**, 111. doi : 10.1186/1742-2094-11-111.

Rogers, N. C., Slack, E. C., Edwards, A. D., Nolte, M. A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D. L., Gordon, S., Tybulewicz, V. L., Brown, G. D. and Reis e Sousa, C. [2005], '**Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins**', *Immunity* **22**(4), 507–517. doi : 10.1016/J.IMMUNI.2005.03.004.

Rothman, S. M., Tanis, K. Q., Gandhi, P., Malkov, V., Marcus, J., Pearson, M., Stevens, R., Gilliland, J., Ware, C., Mahadomrongkul, V., O'Loughlin, E., Zeballos, G., Smith, R., Howell, B. J., Klappenbach, J., Kennedy, M. and Mirescu, C. [2018], '**Human Alzheimer's disease gene expression signatures and immune profile in APP mouse models : A discrete transcriptomic view of Aβ plaque pathology**', *Journal of Neuroinflammation* **15**(1). doi : 10.1186/s12974-018-1265-7.

Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N. and Saido, T. C. [2014], '**Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease**', *Nature Neuroscience* **17**(5), 661–663. doi : 10.1038/nn.3697.

Saito, T., Matsuba, Y., Yamazaki, N., Hashimoto, S. and Saido, T. C. [2016], '**Calpain activation in Alzheimer's model mice is an artifact of APP and presenilin overexpression**', *Journal of Neuroscience* **36**(38), 9933–9936. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1907-16.2016.

Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Fattorelli, N., Thrupp, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Mancuso, R., Chen, W.-T., Woodbury, M. E., Srivastava, G., Möller, T., Hudry, E., Das, S., Saido, T., Karran, E., Hyman, B., Perry, V. H., Fiers, M. and De Strooper, B. [2019], '**The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease : Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to Aβ Plaques**', *Cell Reports* **27**(4), 1293–1306.e6. doi : 10.1016/j.celrep.2019.03.099.

Salamanca, L., Mechawar, N., Murai, K. K., Balling, R., Bouvier, D. S. and Skupin, A. [2019], '**MICMAC : An automated pipeline for high-throughput characterization and classification of three-dimensional microglia morphologies in mouse and human postmortem brain samples**', *Glia* **67**(8), glia.23623. doi : 10.1002/glia.23623.

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A. and Stevens, B. [2012], '**Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner.**', *Neuron* **74**(4), 691–705. doi : 10.1016/j.neuron.2012.03.026.

Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D. and Roses, A. D. [1993], '**Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease.**', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(20), 9649–53. doi : 10.1073/pnas.90.20.9649.

Schmid, C. D., Sautkulis, L. N., Danielson, P. E., Cooper, J., Hasel, K. W., Hilbush, B. S., Sutcliffe, J. G. and Carson, M. J. [2002], '**Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia**', *Journal of Neurochemistry* **83**(6), 1309–1320. doi : 10.1046/j.1471-4159.2002.01243.x.

Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F. and Leube, R. E. [2009], '**Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin**', *Neuroscience* **162**(2), 234–243. doi : 10.1016/j.neuroscience.2009.04.046.

Schöll, M., Ossenkoppele, R., Strandberg, O., Palmqvist, S., Jögi, J., Ohlsson, T., Smith, R. and Hansson, O. [2017], '**Distinct 18F-AV-1451 tau PET retention patterns in early- and late-onset Alzheimer's disease**', *Brain* **140**(9), 2286–2294. doi : 10.1093/brain/awx171.

Schorey, J. S. and Lawrence, C. [2008], '**The pattern recognition receptor Dectin-1 : from fungi to mycobacteria.**', *Current drug targets* **9**(2), 123–9. doi : 10.2174/138945008783502430.

Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E. W., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J. and Geissmann, F. [2012], '**A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells**', *Science* **335**(6077), 86–90. doi : 10.1126/science.1219179.

Schüttelkopf, A. W., Hamilton, G., Watts, C. and Van Aalten, D. M. [2006], '**Structural basis of reduction-dependent activation of human cystatin F**', *Journal of Biological Chemistry* **281**(24), 16570–16575. doi : 10.1074/jbc.M601033200.

Schwarz, J. M., Sholar, P. W. and Bilbo, S. D. [2012], '**Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain.**', *Journal of neurochemistry* **120**(6), 948–63. doi : 10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x.

Sergeant, N., Delacourte, A. and Buée, L. [2005], '**Tau protein as a differential biomarker of tauopathies**', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1739**(2), 179–197. doi : 10.1016/j.bbadis.2004.06.020.

Serrano-Pozo, A., Qian, J., Monsell, S. E., Betensky, R. A., Hyman, B. T. and Massachusetts Alzheimer, P. [2015], '**APOEϵ2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer's disease**', *Ann Neurol* **77**(6), 917–929. doi : 10.1002/ana.24369.

Serrano-Pozo, A., Qian, J., Muzikansky, A., Monsell, S. E., Montine, T. J., Frosch, M. P., Betensky, R. A. and Hyman, B. T. [2016], '**Thal amyloid stages do not significantly impact the correlation between neuropathological change and cognition in the Alzheimer disease continuum**', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **75**(6), 516–526. doi : 10.1093/jnen/nlw026.

Shah, V. B., Huang, Y., Keshwara, R., Ozment-Skelton, T., Williams, D. L. and Keshvara, L. [2008], '**Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner.**', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**(5), 2777–85. doi : 10.4049/jimmunol.180.5.2777.

Shah, V. B., Williams, D. L. and Keshvara, L. [2009], '**beta-Glucan attenuates TLR2- and TLR4-mediated cytokine production by microglia.**', *Neuroscience letters* **458**(3), 111–5. doi : 10.1016/j.neulet.2009.04.039.

Shahidehpour, R. K., Higdon, R. E., Crawford, N. G., Neltner, J. H., Ighodaro, E. T., Patel, E., Price, D., Nelson, P. T. and Bachstetter, A. D. [2021], '**Dystrophic microglia are associated with neurodegenerative disease and not healthy aging in the human brain**', *Neurobiology of Aging* **99**, 19–27. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.003.

Sharma, S., Rakoczy, S. and Brown-Borg, H. [2010], '**Assessment of spatial memory in mice**', *Life Sciences* **87**(17-18), 521–536. doi : 10.1016/j.lfs.2010.09.004.

Sheffield, L. G., Marquis, J. G. and Berman, N. E. [2000], '**Regional distribution of cortical microglia parallels that of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease**', *Neuroscience Letters* **285**(3), 165–168. doi : 10.1016/S0304-3940(00)01037-5.

Shi, L., Zhao, D., Hou, C., Peng, Y., Liu, J., Zhang, S., Liu, J. and Long, J. [2017], '**Early interleukin-6 enhances hepatic ketogenesis in APPSWE/PSEN1dE9 mice via 3-hydroxy-3-methylglutary-CoA synthase 2 signaling activation by p38/nuclear factor κB p65**', *Neurobiology of Aging* **56**, 115–126. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2017.04.014.

Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y. and Sato, K. [2014], '**Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone**', *Journal of Neuroscience* **34**(6), 2231–2243. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014.

Sieber, M. W., Jaenisch, N., Brehm, M., Guenther, M., Linnartz-Gerlach, B., Neumann, H., Witte, O. W. and Frahm, C. [2013], '**Attenuated Inflammatory Response in Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Knock-Out Mice following Stroke**', *PLoS ONE* **8**(1), e52982–e52982. doi : 10.1371/journal.pone.0052982.

Sierksma, A. S., Van Den Hove, D. L., Pfau, F., Philippens, M., Bruno, O., Fedele, E., Ricciarelli, R., Steinbusch, H. W., Vanmierlo, T. and Prickaerts, J. [2014], '**Improvement of spatial memory function in APPswe/PS1dE9 mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D**', *Neuropharmacology* **77**, 120–130. doi : 10.1016/j.neuropharm.2013.09.015.

Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E. and Maletic-Savatic, M. [2010], '**Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis**', *Cell Stem Cell* **7**(4), 483–495. doi : 10.1016/j.stem.2010.08.014.

Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A. C., McEwen, B. S. and Bulloch, K. [2007], '**Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile**', *Glia* **55**(4), 412–424. doi : 10.1002/glia.20468.

Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P. and Rivest, S. [2006], '**Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease**', *Neuron* **49**(4), 489–502. doi : 10.1016/j.neuron.2006.01.022.

Simrén, J., Ashton, N. J., Blennow, K. and Zetterberg, H. [2020], '**An update on fluid biomarkers for neurodegenerative diseases : recent success and challenges ahead**'. doi : 10.1016/j.conb.2019.11.019.

Sims, R., Van Der Lee, S. J., Naj, A. C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Kunkle, B. W., Boland, A., Raybould, R., Bis, J. C., Martin, E. R., Grenier-Boley, B., Heilmann-Heimbach, S., Chouraki, V., Kuzma, A. B., Sleegers, K., Vronskaya, M., Ruiz, A., Graham, R. R., Olaso, R., Hoffmann, P., Grove, M. L., Vardarajan, B. N., Hiltunen, M., Nöthen, M. M., White, C. C., Hamilton-Nelson, K. L., Epelbaum, J., Maier, W., Choi, S. H., Beecham, G. W., Dulary, C., Herms, S., Smith, A. V., Funk, C. C., Derbois, C., Forstner, A. J., Ahmad, S., Li, H., Bacq, D., Harold, D., Satizabal, C. L., Valladares, O., Squassina, A., Thomas, R., Brody, J. A., Qu, L., Sánchez-Juan, P., Morgan, T., Wolters, F. J., Zhao, Y., Garcia, F. S., Denning, N., Fornage, M., Malamon, J., Naranjo, M. C. D., Majounie, E., Mosley, T. H., Dombroski, B., Wallon, D., Lupton, M. K., Dupuis, J., Whitehead, P., Fratiglioni, L., Medway, C., Jian, X., Mukherjee, S., Keller, L., Brown, K., Lin, H., Cantwell, L. B., Panza, F., McGuinness, B., Moreno-Grau, S., Burgess, J. D., Solfrizzi, V., Proitsi, P., Adams, H. H., Allen, M., Seripa, D., Pastor, P., Cupples, L. A., Price, N. D., Hannequin, D., Frank-García, A., Levy, D., Chakrabarty, P., Caffarra, P., Giegling, I., Beiser, A. S., Giedraitis, V., Hampel, H., Garcia, M. E., Wang, X., Lannfelt, L., Mecocci, P., Eiriksdottir, G., Crane, P. K., Pasquier, F., Boccardi, V., Henández, I., Barber, R. C., Scherer, M., Tarraga, L., Adams, P. M., Leber, M., Chen, Y., Albert, M. S., Riedel-Heller, S., Emilsson, V., Beekly, D., Braae, A., Schmidt, R., Blacker, D., Masullo, C., Schmidt, H., Doody, R. S., Spalletta, G., Jr, W. T., Fairchild, T. J., Bossù, P., Lopez, O. L., Frosch, M. P., Sacchinelli, E., Ghetti, B., Yang, Q., Huebinger, R. M., Jessen, F., Li, S., Kamboh, M. I.,

Morris, J. C., Sotolongo-Grau, O., Katz, M. J., Corcoran, C., Dunstan, M., Braddel, A., Thomas, C., Meggy, A., Marshall, R., Gerrish, A., Chapman, J., Aguilar, M., Taylor, S., Hill, M., Fairén, M. D., Hodges, A., Vellas, B., Soininen, H., Kloszewska, I., Daniilidou, M., Uphill, J., Patel, Y., Hughes, J. T., Lord, J., Turton, J., Hartmann, A. M., Cecchetti, R., Fenoglio, C., Serpente, M., Arcaro, M., Caltagirone, C., Orfei, M. D., Ciaramella, A., Pichler, S., Mayhaus, M., Gu, W., Lleó, A., Fortea, J., Blesa, R., Barber, I. S., Brookes, K., Cupidi, C., Maletta, R. G., Carrell, D., Sorbi, S., Moebus, S., Urbano, M., Pilotto, A., Kornhuber, J., Bosco, P., Todd, S., Craig, D., Johnston, J., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Fox, N. C., Hardy, J., Albin, R. L., Apostolova, L. G., Arnold, S. E., Asthana, S., Atwood, C. S., Baldwin, C. T., Barnes, L. L., Barral, S., Beach, T. G., Becker, J. T., Bigio, E. H., Bird, T. D., Boeve, B. F., Bowen, J. D., Boxer, A., Burke, J. R., Burns, J. M., Buxbaum, J. D., Cairns, N. J., Cao, C., Carlson, C. S., Carlsson, C. M., Carney, R. M., Carrasquillo, M. M., Carroll, S. L., Diaz, C. C., Chui, H. C., Clark, D. G., Cribbs, D. H., Crocco, E. A., Decarli, C., Dick, M., Duara, R., Evans, D. A., Faber, K. M., Fallon, K. B., Fardo, D. W., Farlow, M. R., Ferris, S., Foroud, T. M., Galasko, D. R., Gearing, M., Geschwind, D. H., Gilbert, J. R., Graff-Radford, N. R., Green, R. C., Growdon, J. H., Hamilton, R. L., Harrell, L. E., Honig, L. S., Huentelman, M. J., Hulette, C. M., Hyman, B. T., Jarvik, G. P., Abner, E., Jin, L. W., Jun, G., Karydas, A., Kaye, J. A., Kim, R., Kowall, N. W., Kramer, J. H., Laferla, F. M., Lah, J. J., Leverenz, J. B., Levey, A. I., Li, G., Lieberman, A. P., Lunetta, K. L., Lyketsos, C. G., Marson, D. C., Martiniuk, F., Mash, D. C., Masliah, E., McCormick, W. C., McCurry, S. M., McDavid, A. N., McKee, A. C., Mesulam, M., Miller, B. L., Miller, C. A., Miller, J. W., Murrell, J. R., Myers, A. J., O'Bryant, S., Olichney, J. M., Pankratz, V. S., Parisi, J. E., Paulson, H. L., Perry, W., Peskind, E., Pierce, A., Poon, W. W., Potter, H., Quinn, J. F., Raj, A., Raskind, M., Reisberg, B., Reitz, C., Ringman, J. M., Roberson, E. D., Rogaeva, E., Rosen, H. J., Rosenberg, R. N., Sager, M. A., Saykin, A. J., Schneider, J. A., Schneider, L. S., Seeley, W. W., Smith, A. G., Sonnen, J. A., Spina, S., Stern, R. A., Swerdlow, R. H., Tanzi, R. E., Thornton-Wells, T. A., Trojanowski, J. Q., Troncoso, J. C., Van Deerlin, V. M., Van Eldik, L. J., Vinters, H. V., Vonsattel, J. P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K. A., Wilhelmsen, K. C., Williamson, J., Wingo, T. S., Woltjer, R. L., Wright, C. B., Yu, C. E., Yu, L., Garzia, F., Golamaully, F., Septier, G., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., De Deyn, P. P., Fernadez, C. M., Benito, Y. A., Thonberg, H., Forsell, C., Lilius, L., Kinhult-Stählbom, A., Kilander, L., Brundin, R., Concari, L., Helisalmi, S., Koivisto, A. M., Haapasalo, A., Dermecourt, V., Fievet, N., Hanon, O., Dufouil, C., Brice, A., Ritchie, K., Dubois, B., Himali, J. J., Keene, C. D., Tschanz, J., Fitzpatrick, A. L., Kukull, W. A., Norton, M., Aspelund, T., Larson, E. B., Munger, R., Rotter, J. I., Lipton, R. B., Bullido, M. J., Hofman, A., Montine, T. J., Coto, E., Boerwinkle, E., Petersen, R. C., Alvarez, V., Rivadeneira, F., Reiman, E. M., Gallo, M., O'Donnell, C. J., Reisch, J. S., Bruni, A. C., Royall, D. R., Dichgans, M., Sano, M., Galimberti, D., St George-Hyslop, P., Scarpini, E., Tsuang, D. W., Mancuso, M., Bonuccelli, U., Winslow, A. R., Daniele, A., Wu, C. K., Peters, O., Nacmias, B., Riemenschneider, M., Heun, R., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Bras, J., Guerreiro, R., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Collinge, J., Tsolaki, M., Clarimón, J., Sussams, R., Lovestone, S., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Behrens, T. W., Mead, S., Uitterlinden, A. G., Holmes, C., Cruchaga, C., Ingelsson, M., Bennett, D. A., Powell, J., Golde, T. E., Graff, C., De Jager, P. L., Morgan, K., Ertekin-Taner, N., Combarros, O., Psaty, B. M., Passmore, P., Younkin, S. G., Berr, C., Gudnason, V., Rujescu, D., Dickson, D. W., Dartigues, J. F., Destefano, A. L., Ortega-Cubero, S., Hakonarson, H., Campion, D., Boada, M., Kauwe, J. K., Farrer, L. A., Van Broeckhoven, C., Ikram, M. A., Jones, L., Haines, J. L., Tzourio, C., Tzourio, C., Escott-Price, V., Mayeux, R., Deleuze, J. F., Amin, N., Goate, A. M., Pericak-Vance, M. A., Amouyel, P., Van Duijn, C. M., Ramirez, A., Wang, L. S., Lambert, J. C., Seshadri, S., Williams, J. and Schellenberg, G. D. [2017], '**Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease**', *Nature Genetics* **49**(9), 1373–1384. doi : 10.1038/ng.3916.

Smith, A. M. and Dragunow, M. [2014], '**The human side of microglia**', *Trends in Neurosciences* **37**(3), 125–135. doi : 10.1016/j.tins.2013.12.001.

Smith, A. M., Gibbons, H. M., Oldfield, R. L., Bergin, P. M., Mee, E. W., Curtis, M. A., Faull, R. L. and Dragunow, M. [2013], '**M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia**', *Journal of Neuroinflammation* **10**. doi : 10.1186/1742-2094-10-85.

Solano Fonseca, R., Mahesula, S., Apple, D. M., Raghunathan, R., Dugan, A., Cardona, A., O'Connor, J. and Kokovay, E. [2016], '**Neurogenic niche microglia undergo positional remodeling and progressive activation contributing to age-associated reductions in neurogenesis**', *Stem Cells and Development* **25**(7), 542–555. doi : 10.1089/scd.2015.0319.

Sos, K. E., Mayer, M. I., Takács, V. T., Major, A., Bardóczi, Z., Beres, B. M., Szeles, T., Saito, T., Saido, T. C., Mody, I., Freund, T. F. and Nyiri, G. [2020], '**Amyloid β induces interneuron-specific changes in the hippocampus of APPNL-F mice**', *PLoS ONE* **15**(5). doi : 10.1371/journal.pone.0233700.

Stansley, B., Post, J. and Hensley, K. [2012], '**A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease**', *Journal of Neuroinflammation* **9**(1), 115. doi : 10.1186/1742-2094-9-115.

Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A. G., Zheng, M., Brown, G. D., Gordon, S., Shellito, J. E. and Kolls, J. K. [2003], '**Alveolar Macrophage-mediated Killing of Pneumocystis carinii f. sp. muris Involves Molecular Recognition by the Dectin-1 β-Glucan Receptor**', *Journal of Experimental Medicine* **198**(11), 1677–1688. doi : 10.1084/jem.20030932.

Steinau, M., Unger, E. R., Vernon, S. D., Jones, J. F. and Rajeevan, M. S. [2004], '**Differential-display PCR of peripheral blood for biomarker discovery in chronic fatigue syndrome**', *Journal of Molecular Medicine* **82**(11), 750–755. doi : 10.1007/s00109-004-0586-4.

Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H. and Murtagh, F. R. [1995], '**An English translation of Alzheimer's 1907 Paper**', *Clinical Anatomy* **8**, 429–472. doi : 10.1002/ca.980080612.

Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W. and Barres, B. A. [2007], '**The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination**', *Cell* **131**(6), 1164–1178. doi : 10.1016/j.cell.2007.10.036.

Stratoulias, V., Venero, J. L., Tremblay, M. and Joseph, B. [2019], '**Microglial subtypes : diversity within the microglial community**', *The EMBO Journal* **38**(17), e101997. doi : 10.15252/embj.2019101997.

Streit, W. J., Sammons, N. W., Kuhns, A. J. and Sparks, D. L. [2004], '**Dystrophic Microglia in the Aging Human Brain**', *GLIA* **45**(2), 208–212. doi : 10.1002/glia.10319.

Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L.-M., Salvesen1, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaberii, D. and Roses, A. D. [1993], '**Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid ,B peptide : Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease**', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8098–8102. doi : 10.1073/pnas.90.17.8098.

Sudduth, T. L., Schmitt, F. A., Nelson, P. T. and Wilcock, D. M. [2013], '**Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease**', *Neurobiology of Aging* **34**(4), 1051–1059. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.012.

Sultana, R., Banks, W. A. and Butterfield, D. A. [2010], '**Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of BCl2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnestic mild cognitive impairment : Insights into their potential roles**

for loss of synapses and memory, accumulation of Aβ,', *Journal of Neuroscience Research* **88**(3), 469–477. doi : 10.1002/jnr.22227.

Surendranathan, A., Rowe, J. B. and O'Brien, J. T. [2015], '**Neuroinflammation in Lewy body dementia**', *Parkinsonism and Related Disorders* **21**(12), 1398–1406. doi : 10.1016/j.parkreldis.2015.10.009.

Takahashi, K., Rochford, C. D. P. and Neumann, H. [2005], '**Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2.**', *The Journal of experimental medicine* **201**(4), 647–657. doi : 10.1084/jem.20041611.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. [2007], '**Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors**', *Cell* **131**(5), 861–872. doi : 10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takata, K., Kozaki, T., Lee, C. Z. W., Thion, M. S., Otsuka, M., Lim, S., Utami, K. H., Fidan, K., Park, D. S., Malleret, B., Chakarov, S., See, P., Low, D., Low, G., Garcia-Miralles, M., Zeng, R., Zhang, J., Goh, C. C., Gul, A., Hubert, S., Lee, B., Chen, J., Low, I., Shadan, N. B., Lum, J., Wei, T. S., Mok, E., Kawanishi, S., Kitamura, Y., Larbi, A., Poidinger, M., Renia, L., Ng, L. G., Wolf, Y., Jung, S., Onder, T., Newell, E., Huber, T., Ashihara, E., Garel, S., Pouladi, M. A. and Ginhoux, F. [2017], '**Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function**', *Immunity* **47**(1), 183–198 e6. doi : 10.1016/j.immuni.2017.06.017.

Tan, Y. L., Yuan, Y. and Tian, L. [2020], '**Microglial regional heterogeneity and its role in the brain**', *Molecular Psychiatry* **25**(2), 351–367. doi : 10.1038/s41380-019-0609-8.

Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. and Wong, S. Y. C. [2002], '**The β-Glucan Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of Cells of the Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages**', *The Journal of Immunology* **169**(7), 3876–3882. doi : 10.4049/jimmunol.169.7.3876.

Thrupp, N., Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Skene, N. G., Fattorelli, N., Poovathingal, S., Fourne, Y., Matthews, P. M., Theys, T., Mancuso, R., de Strooper, B. and Fiers, M. [2020], '**Single-Nucleus RNA-Seq Is Not Suitable for Detection of Microglial Activation Genes in Humans**', *Cell Reports* **32**(13). doi : 10.1016/j.celrep.2020.108189.

Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L. J. and Corey-Bloom, J. [2004], '**Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease**', *Neurology* **62**(11), 1977–1983. doi : 10.1212/01.WNL.0000128091.92139.0F.

Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B. and Mechawar, N. [2014], '**Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex**', *Journal of Neuroinflammation* **11**. doi : 10.1186/1742-2094-11-12.

Tremblay, M. È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V. and Sierra, A. [2015], '**From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia**'. doi : 10.3389/fnana.2015.00045.

Tremblay, M. È., Zettel, M. L., Ison, J. R., Allen, P. D. and Majewska, A. K. [2012], '**Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices**', *Glia* **60**(4), 541–558. doi : 10.1002/glia.22287.

Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. and Abraham, W. C. [2003], '**Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory**'. doi : 10.1016/S0301-0082(03)00089-3.

Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C.-C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S., Cella, M., Virgin, H. W., Unanue, E. R., Wang, Y., Artyomov, M. N., Holtzman, D. M. and Colonna, M. [2017], '**TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease.**', *Cell* **170**(4), 649–663.e13. doi : 10.1016/j.cell.2017.07.023.

Ulrich, J. D., Finn, M., Wang, Y., Shen, A., Mahan, T. E., Jiang, H., Stewart, F. R., Piccio, L., Colonna, M. and Holtzman, D. M. [2014], '**Altered microglial response to Aβ plaques in APPPS1-21 mice heterozygous for TREM2**', *Molecular Neurodegeneration* **9**(1), 20. doi : 10.1186/1750-1326-9-20.

Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. A. and Simmons, R. M. [2005], '**Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production**', *Blood* **106**(7), 2543–2550. doi : 10.1182/blood-2005-03-1239.

Utsunomiya, T., Hara, Y., Kataoka, A., Morita, M., Arakawa, H., Mori, M. and Nishimura, S. [2002], '**Cystatin-like metastasis-associated protein mRNA expression in human colorectal cancer is associated with both liver metastasis and patient survival**', *Clinical Cancer Research* **8**(8), 2591–2594. doi : No doi.

Vandersteen, A., Hubin, E., Sarroukh, R., De Baets, G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Subramaniam, V., Raussens, V., Wenschuh, H., Wildemann, D. and Broersen, K. [2012], '**A comparative analysis of the aggregation behavior of amyloid-β peptide variants**', *FEBS Letters* **586**(23), 4088–4093. doi : 10.1016/j.febslet.2012.10.022.

Verdonk, F., Roux, P., Flamant, P., Fiette, L., Bozza, F. A., Simard, S., Lemaire, M., Plaud, B., Shorte, S. L., Sharshar, T., Chrétien, F. and Danckaert, A. [2016], '**Phenotypic clustering : a novel method for microglial morphology analysis**', *Journal of Neuroinflammation* **13**(1), 153. doi : 10.1186/S12974-016-0614-7.

Verheijen, J. and Sleegers, K. [2018], '**Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics**', *Trends Genet* **34**(6), 434–447. doi : 10.1016/j.tig.2018.02.007.

Viana da Silva, S., Haberl, M. G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Gonçalves, N., Gorlewicz, A., Malezieux, M., Gonçalves, F. Q., Grosjean, N., Blanchet, C., Frick, A., Nägerl, U. V., Cunha, R. A. and Mulle, C. [2016], '**Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors.**', *Nature communications* **7**, 11915. doi : 10.1038/ncomms11915.

Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., Lolli, F., Marcello, E., Sironi, L., Vegeto, E. and Maggi, A. [2018], '**Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice.**', *Cell reports* **23**(12), 3501–3511. doi : 10.1016/j.celrep.2018.05.048.

Viña, J. and Lloret, A. [2010], '**Why Women Have More Alzheimer's Disease Than Men : Gender and Mitochondrial Toxicity of Amyloid-β Peptide**', *Journal of Alzheimer's Disease* **20**(s2), S527–S533. doi : 10.3233/JAD-2010-100501.

Vitek, M. P., Brown, C. M. and Colton, C. A. [2009], '**APOE genotype-specific differences in the innate immune response**', *Neurobiology of Aging* **30**(9), 1350–1360. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.014.

Vogels, T., Murgoci, A. N. and Hromádka, T. [2019], '**Intersection of pathological tau and microglia at the synapse**', *Acta neuropathologica communications* **7**(1), 109. doi : 10.1186/s40478-019-0754-y.

Volianskis, A., Køstner, R., Mølgaard, M., Hass, S. and Jensen, M. S. [2010], '**Episodic memory deficits are not related to altered glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the CA1 hippocampus of the APPswe/PS1E9-deleted transgenic mice model of amyloidosis**', *Neurobiology of Aging* **31**, 1173–1187. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.005.

Vom Berg, J., Prokop, S., Miller, K. R., Obst, J., Kälin, R. E., Lopategui-Cabezas, I., Wegner, A., Mair, F., Schipke, C. G., Peters, O., Winter, Y., Becher, B. and Heppner, F. L. [2012], '**Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's diseasea-like pathology and cognitive decline**', *Nature Medicine* **18**(12), 1812–1819. doi : 10.1038/nm.2965.

Wahl, D., Coogan, S. C., Solon-Biet, S. M., de Cabo, R., Haran, J. B., Raubenheimer, D., Cogger, V. C., Mattson, M. P., Simpson, S. J. and Le Couteur, D. G. [2017], '**Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia.**', *Clinical interventions in aging* **12**, 1419–1428. doi : 10.2147/CIA.S145247.

Walker, L. C., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Roher, A. E. and Lipinski, W. J. [2002], '**Exogenous induction of cerebral-amyloidosis in APP-transgenic mice**', *Peptides* **23**, 1241–1247. doi : 10.1016/s0196-9781(02)00059-1.

Wang, D., Gao, S., Chen, J., Zhao, Y., Jiang, Y., Chu, X., Wang, X., Liu, N., Qin, T., Yi, Q., Yue, Y. and Wang, S. [2018], '**Dectin-1 stimulates IL-33 expression in dendritic cells via upregulation of IRF4**', *Laboratory Investigation* **98**(6), 708–714. doi : 10.1038/s41374-018-0047-2.

Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., Gilfillan, S., Krishnan, G. M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B. H., Holtzman, D. M., Cirrito, J. R. and Colonna, M. [2015], '**TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model**', *Cell* **160**(6), 1061–1071. doi : 10.1016/j.cell.2015.01.049.

Wang, Y., Zhang, X., Song, Q., Hou, Y., Liu, J., Sun, Y. and Wang, P. [2020], '**Characterization of the chromatin accessibility in an Alzheimer's disease (AD) mouse model**', *Alzheimer's Research and Therapy* **12**(1). doi : 10.1186/s13195-020-00598-2.

Wegiel, J., Bobinski, M., Tarnawski, M., Dziewiatkowski, J., Popovitch, E., Bobinski, M., Lach, B., Reisberg, B., Miller, D. C., Santi, S. D. and De Leon, M. J. [2001], '**Shift from fibrillar to nonfibrillar Aβ deposits in the neocortex of subjects with Alzheimer disease**', *Journal of Alzheimer's Disease* **3**, 49–57. doi : 10.3233/jad-2001-3108.

Wegiel, J., Imaki, H., Wang, K. C., Wegiel, J. and Rubenstein, R. [2004], '**Cells of monocyte/microglial lineage are involved in both microvessel amyloidosis and fibrillar plaque formation in APPsw tg mice**', *Brain Research* **1022**(1-2), 19–29. doi : 10.1016/j.brainres.2004.06.058.

Weinhard, L., Neniskyte, U., Vadisiute, A., di Bartolomei, G., Aygün, N., Riviere, L., Zonfrillo, F., Dymecki, S. and Gross, C. [2018], '**Sexual dimorphism of microglia and synapses during mouse postnatal development.**', *Developmental neurobiology* **78**(6), 618–626. doi : 10.1002/dneu.22568.

Wendt, S., Maricos, M., Vana, N., Meyer, N., Guneykaya, D., Semtner, M. and Kettenmann, H. [2017], '**Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease**', *Neurobiology of Aging* **58**, 41–53. doi : 10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.027.

Werle, B., Sauckel, K., Nathanson, C. M., Bjarnadottir, M., Spiess, E., Ebert, W. and Abrahamson, M. [2003], '**Cystatins C, E/M and F in human pleural fluids of patients with neoplastic and inflammatory lung disorders**', *Biological Chemistry* **384**(2), 281–287. doi : 10.1515/BC.2003.031.

Whyte, L. S., Lau, A. A., Hemsley, K. M., Hopwood, J. J. and Sargeant, T. J. [2017], '**Endo-lysosomal and autophagic dysfunction : a driving factor in Alzheimer's disease ?**', *Journal of Neurochemistry* **140**(5), 703–717. doi : 10.1111/jnc.13935.

Wilkinson, B. L. and Landreth, G. E. [2006], '**The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease**', *Journal of Neuroinflammation* **3**. doi : 10.1186/1742-2094-3-30.

Willment, J. A., Gordon, S. and Brown, G. D. [2001], '**Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms.**', *The Journal of biological chemistry* **276**(47), 43818–23. doi : 10.1074/jbc.M107715200.

Willment, J. A., Lin, H.-H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y. C., Gordon, S. and Brown, G. D. [2003], '**Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide**', *The Journal of Immunology* **171**(9), 4569–4573. doi : 10.4049/jimmunol.171.9.4569.

Willment, J. A., Marshall, A. S., Reid, D. M., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S. and Brown, G. D. [2005], '**The human β-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells**', *European Journal of Immunology* **35**(5), 1539–1547. doi : 10.1002/eji.200425725.

Wolf, S. A., Boddeke, H. and Kettenmann, H. [2017], '**Microglia in Physiology and Disease**', *Annual Review of Physiology* **79**(1), 619–643. doi : 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.

Wu, Y., Du, S., Johnson, J. L., Tung, H.-Y., Landers, C. T., Liu, Y., Seman, B. G., Wheeler, R. T., Costa-Mattioli, M., Kheradmand, F., Zheng, H. and Corry, D. B. [2019], '**Microglia and amyloid precursor protein coordinate control of transient Candida cerebritis with memory deficits.**', *Nature communications* **10**(1), 58. doi : 10.1038/s41467-018-07991-4.

Yanguas-Casás, N., Crespo-Castrillo, A., de Ceballos, M. L., Chowen, J. A., Azcoitia, I., Arevalo, M. A. and Garcia-Segura, L. M. [2018], '**Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid**', *Glia* **66**(3), 522–537. doi : 10.1002/glia.23263.

Yasumoto, T., Takamura, Y., Tsuji, M., Watanabe-Nakayama, T., Imamura, K., Inoue, H., Nakamura, S., Inoue, T., Kimura, A., Yano, S., Nishijo, H., Kiuchi, Y., Teplow, D. B. and Ono, K. [2019], '**High molecular weight amyloid β1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage**', *FASEB Journal* **33**(8), 9220–9234. doi : 10.1096/fj.201900604R.

Ye, X.-C., Hao, Q., Ma, W.-J., Zhao, Q.-C., Wang, W.-W., Yin, H.-H., Zhang, T., Wang, M., Zan, K., Yang, X.-X., Zhang, Z.-H., Shi, H.-J., Zu, J., Raza, H. K., Zhang, X.-L., Geng, D.-Q., Hu, J.-X. and Cui, G.-Y. [2020], '**Dectin-1/Syk signaling triggers neuroinflammation after ischemic stroke in mice**', *Journal of Neuroinflammation* **17**(1), 17. doi : 10.1186/s12974-019-1693-z.

Yeh, F. L., Hansen, D. V. and Sheng, M. [2017], '**TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases**', *Trends in Molecular Medicine* **23**(6), 512–533. doi : 10.1016/j.molmed.2017.03.008.

Yin, Z., Raj, D. D., Schaafsma, W., Van Der Heijden, R. A., Kooistra, S. M., Reijne, A. C., Zhang, X., Moser, J., Brouwer, N., Heeringa, P., Yi, C. X., Van Dijk, G., Laman, J. D., Boddeke, E. W. and Eggen, B. J. [2018], '**Low-fat diet with caloric restriction reduces white matter microglia activation during aging**', *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**. doi : 10.3389/fnmol.2018.00065.

Yokota, K., Takashima, A., Bergstresser, P. R. and Ariizumi, K. [2001], '**Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1**', *Gene* **272**(1-2), 51–60. doi : 10.1016/S0378-1119(01)00528-5.

Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Kobayashi, K., Brown, G. D., Tagami, T., Sakihama, T., Hirota, K., Tanaka, S., Nomura, T., Miki, I., Gordon, S., Akira, S., Nakamura, T. and Sakaguchi, S. [2005], '**A role for fungal β-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice**', *Journal of Experimental Medicine* **201**(6), 949–960. doi : 10.1084/jem.20041758.

Zelensky, A. N. and Gready, J. E. [2005], '**The C-type lectin-like domain superfamily**', *FEBS Journal* **272**(24), 6179–6217. doi : 10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x.

Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D. and Gross, C. T. [2014], '**Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior**', *Nature Neuroscience* **17**(3), 400–406. doi : 10.1038/nn.3641.

Zhang, D., Pekkanen-Mattila, M., Shahsavani, M., Falk, A., Teixeira, A. I. and Herland, A. [2014], '**A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons**', *Biomaterials* **35**(5), 1420–1428. doi : 10.1016/j.biomaterials.2013.11.028.

Zhang, H., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, O., Saito, T., Saido, T. and Bezprozvanny, I. [2015], '**Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease**', *Journal of Neuroscience* **35**(39), 13275–13286. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1034-15.2015.

Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., Zhao, H.-L., Xx, Z., Yh, P., Ym, H. and Neuroendocrine, Z. H. [2016], '**Neuroendocrine hormone amylin in diabetes**', *World J Diabetes* **7**(79), 189–197. doi : 10.4239/wjd.v7.i9.189.

Zhang, Y. and Wang, P. [2018], '**Age-related increase of insulin-degrading enzyme is inversely correlated with cognitive function in APPswe/PS1dE9 mice**', *Medical Science Monitor* **24**, 2446–2455. doi : 10.12659/MSM.909596.

Zhao, Y., Wu, X., An, Z., Huang, T. Y., Xu, H., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y., Zhu, B., Piñ A-Crespo, J. C., Zhang, M., Zhang, N., Chen, X. and Bu, G. [2018], '**TREM2 Is a Receptor for β-Amyloid that Mediates Microglial Function**', *Neuron* **97**, 1023–1031.e7. doi : 10.1016/j.neuron.2018.01.031.

Zhong, L., Wang, Z., Wang, D., Wang, Z., Martens, Y. A., Wu, L., Xu, Y., Wang, K., Li, J., Huang, R., Can, D., Xu, H., Bu, G. and Chen, X.-F. [2018], '**Amyloid-beta modulates microglial responses by binding to the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)**', *Molecular Neurodegeneration* **13**(1), 15. doi : 10.1016/j.neuron.2016.05.003.

Zhu, Y., Nwabuisi-Heath, E., Dumanis, S. B., Tai, L. M., Yu, C., Rebeck, G. W. and Ladu, M. J. [2012], '**APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice**', *GLIA* **60**(4), 559–569. doi : 10.1002/glia.22289.

Zimmer, E. R., Leuzy, A., Benedet, A. L., Breitner, J., Gauthier, S. and Rosa-Neto, P. [2014], '**Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease : The role of positron emission tomography imaging**', *Journal of Neuroinflammation* **11**. doi : 10.1186/1742-2094-11-120.

A

Publication 1

frontiers in Aging Neuroscience

REVIEW
published: 30 August 2019
doi: 10.3389/fnagi.2019.00233

Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities

Anne-Laure Hemonnot†, Jennifer Hua†, Lauriane Ulmann‡ and Hélène Hirbec‡*

Institute for Functional Genomics (IGF), University of Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifiifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Montpellier, France

Microglia are the resident macrophages of the central nervous system. They play key roles in brain development, and physiology during life and aging. Equipped with a variety of molecular sensors and through the various functions they can fulfill, they are critically involved in maintaining the brain's homeostasis. In Alzheimer disease (AD), microglia reaction was initially thought to be incidental and triggered by amyloid deposits and dystrophic neurites. However, recent genome-wide association studies have established that the majority of AD risk loci are found in or near genes that are highly and sometimes uniquely expressed in microglia. This leads to the concept of microglia being critically involved in the early steps of the disease and identified them as important potential therapeutic targets. Whether microglia reaction is beneficial, detrimental or both to AD progression is still unclear and the subject of intense debate. In this review, we are presenting a state-of-knowledge report intended to highlight the variety of microglial functions and pathways shown to be critically involved in AD progression. We first address both the acquisition of new functions and the alteration of their homeostatic roles by reactive microglia. Second, we propose a summary of new important parameters currently emerging in the field that need to be considered to identify relevant microglial targets. Finally, we discuss the many obstacles in designing efficient therapeutic strategies for AD and present innovative technologies that may foster our understanding of microglia roles in the pathology. Ultimately, this work aims to fly over various microglial functions to make a general and reliable report of the current knowledge regarding microglia's involvement in AD and of the new research opportunities in the field.

Keywords: Alzheimer disease, microglia, neuroinflammation, microglia diversity, purinergic signaling, sexual dimorphism, early stage, hiPSCs

OPEN ACCESS

Edited by:
Patrizia Giannoni, University of Nîmes, France

Reviewed by:
Anna Maria Colangelo, University of Milano-Bicocca, Italy
Johannes Boltze, University of Warwick, United Kingdom

***Correspondence:**
Hélène Hirbec
helene.hirbec@igf.cnrs.fr

†These authors have contributed equally to this work as co-first authors

‡These authors have contributed equally to this work as co-last authors

Received: *27 May 2019*
Accepted: *14 August 2019*
Published: *30 August 2019*

Citation:
Hemonnot A-L, Hua J, Ulmann L and Hirbec H (2019) Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities. Front. Aging Neurosci. 11:233. doi: 10.3389/fnagi.2019.00233

INTRODUCTION

Microglia cells are the main immunocompetent cells in the brain. They colonize the brain in the early prenatal period (Ginhoux et al., 2010), but contrary to other tissue resident macrophages, they remain secluded within the CNS throughout life and self-renew at slow pace (Ajami et al., 2007). Importantly, the CNS microenvironment significantly shapes the microglia's phenotype, endowing them with specific important homeostatic and supportive brain functions (Kierdorf and Prinz, 2017). Should the brain homeostasis be compromised, microglia change their phenotype and initiate a defense program. Thus, under pathological conditions, they adopt reactive states

characterized by multiple morphological and functional changes including but not limited to increased phagocytosis and increased expression of receptors, cytokines, chemokines and additional inflammation related molecules (Wolf et al., 2017).

Alzheimer's disease (AD) classical hallmarks include brain atrophy, extracellular amyloid-beta (Aβ) deposits, intracellular aggregated phosphorylated tau, dystrophic neurites, synapses and neurons loss (Bedner et al., 2015). The presence of reactive glial cells within the neuritic plaques was described by Alois Alzheimer himself (Alzheimer, 1907; Graeber et al., 1997) and further studies identified both reactive astrocytes and microglia in the vicinity of the Aβ deposits (Verkhratsky et al., 2016). Long considered as a consequence of the pathology, reactive glia and associated neuroinflammation are now regarded as playing key roles in both disease initiation and progression. Indeed, Human genetic studies identified over 25 genetic loci that robustly associate with AD risk (Hansen et al., 2018; Verheijen and Sleegers, 2018). Among them, most of the common (ApoE, Sp1l) or rare (Trem2, Cd33) genetic variants code for proteins that are preferentially or exclusively expressed in microglia. These findings strongly support a causal involvement of microglial cells in AD pathogenesis and generated a strong interest for studying these cells in AD. Yet, the roles of microglia in AD initiation and progression are unclear and heavily debated, with conflicting reports regarding their detrimental or protective contribution to the disease.

In the present review, we have summarized the main findings regarding the role of microglia in AD. Microglia reaction is known to be associated with the acquisition of many immune functions which are triggered by the activation of receptors designed to recognize danger or pathogen associated molecular patterns (DAMPs/PAMPs). Its role is to restore homeostasis and is also associated with the loss or the alteration of homeostatic functions which are important for brain physiological functioning. In the two first parts, we thus provide an overview of the microglial functions and pathways that are known to be altered during AD. We then highlight factors such as mouse models, sex, age whose influence may have been under-examined in assessing the contribution of microglial cells to the disease progression. Finally, we identified new research topics that are likely to foster our understanding of the roles of microglia to AD initiation and progression and may help design more targeted therapeutic strategies.

NEW FUNCTIONS FOR REACTIVE MICROGLIA IN AD

Neuroinflammation is a common feature of neurodegenerative diseases and inflammatory processes are thus among the most studied microglial functions in AD. Microglia, which represent the main immune cells of the brain, have been shown to play key roles in orchestrating this brain inflammation. In the following section, we are reporting the main microglial processes involved in neuroinflammation (**Figure 1**, top part). However, more detailed description of these processes can be found in recent reviews that are focusing on these specific points (Labzin et al., 2017; Nizami et al., 2019).

Inflammasomes Are Central Hubs for Cytokines Production

One of inflammation hallmarks is the release of cytokines. This secretion requires the activation of inducible multiproteic complexes called inflammasomes. Several inflammasomes have been characterized but the most important microglial contributor in pathologies is certainly the NLRP3. It is composed of the sensor protein NLRP3 and the adaptor protein apoptosis associated Speck-like protein (ASC), which contains a caspase recruitment domain. ASC can recruit and activate pro-caspase-1. When stimulated, the complex induces the cleavage of pro-caspase-1 into active caspase-1, which in turn cleaves pro-IL-1β and IL-18 triggering their release in the extracellular space (Martinon et al., 2002). NLRP3 activation pathway is not fully characterized, but the current view is that NLRP3 activation requires the occurrence of two independent but co-concomitant priming and activation signals (Próchnicki et al., 2016).

In the context of AD, IL-1β is known to elicit the secretion of NO and TNFα, promoting the formation of deleterious amyloid plaques and neuronal degeneration (Griffin et al., 1989). In accordance with these data, frontal cortex from AD patients exhibit an increase of caspase-1 which is correlated with an attenuation of Aβ peptide phagocytosis (Burguillos et al., 2011; Heneka et al., 2013). Likewise, genetic deletion of NLRP3 in mice with familiar AD associated mutation reduces the level of IL-1β and Aβ deposits, and correlates with positive impacts on synaptic dysfunction and cognitive performances (Heneka et al., 2013).

Other members of the caspase family are also involved in AD pathology. Interestingly, the activity of caspase-3 prematurely increases in hippocampal neurons in an AD mouse model (D'Amelio et al., 2011). Similarly, in samples from AD patients, caspase-8 and -3 are upregulated in cortical microglia (Burguillos et al., 2011). Microglial caspase-3 around amyloid plaques also present a cytosolic location, suggesting a non-apoptotic role of caspases in AD (Burguillos et al., 2011). Such evidence has also been described in others degenerative models such as brain ischemia, in which reactive astrocytes and microglia express cytoplasmic non-apoptotic caspase-3 (Wagner et al., 2011). This non-nuclear localization could be involved in cytoplasmic rearrangement and modifications of cell populations surrounding lesions. Although it is undeniable that caspase signaling is crucial in the development of AD, the delay of activation and the pathway downstream of each of them need to be clarified.

The Complement System, the Microglial Way of Eating Synapses?

The complement pathway is part of the innate immune system and mediates the recognition and elimination of pathogens and cellular debris. It is involved in many physiological and pathological functions throughout life, including activity-dependent synapse elimination during

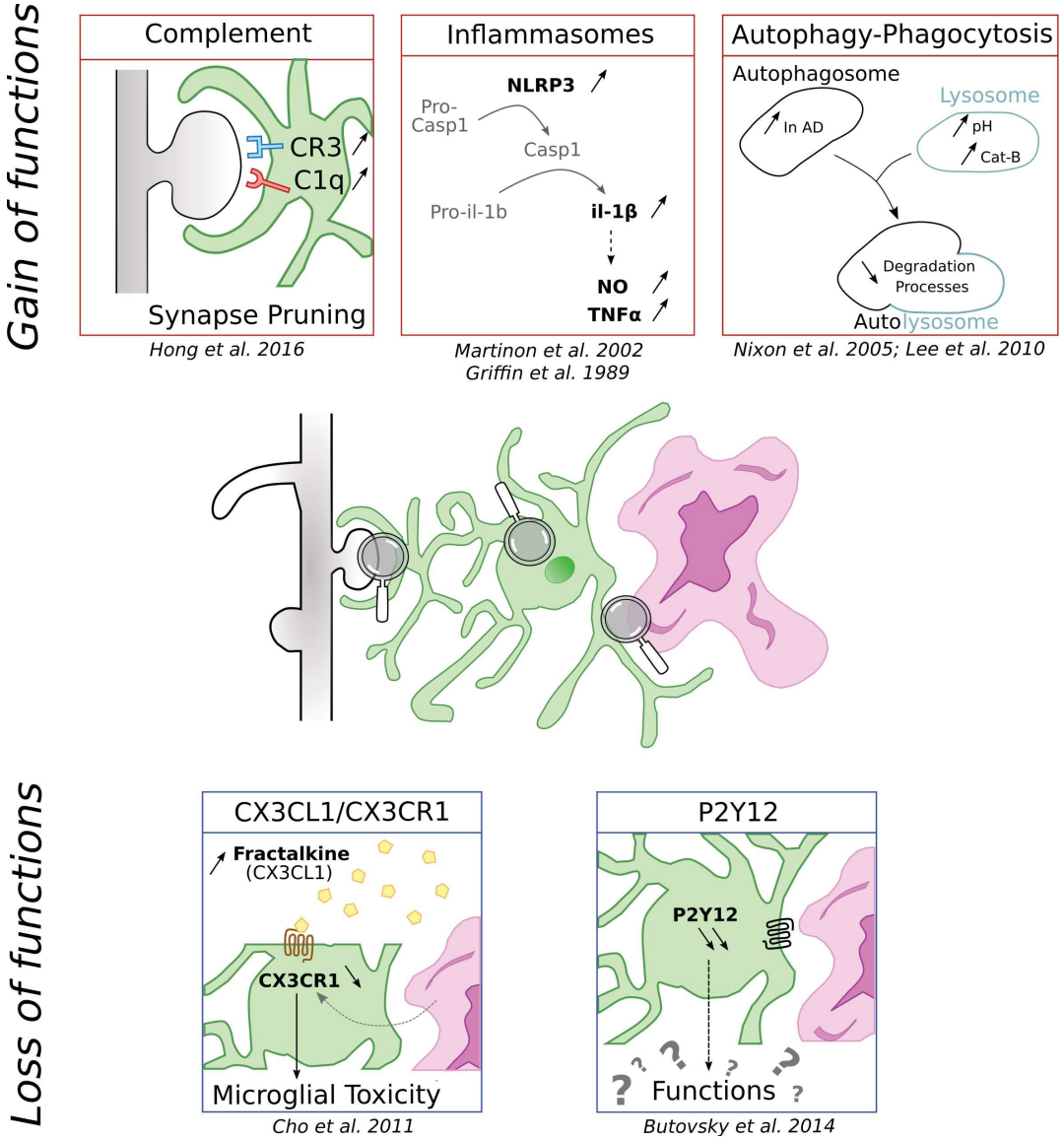


FIGURE 1 | Schematic representation of functions microglial cells can loose and gain in context of AD. Microglia is represented in green associated to amyloid-β deposit in purple and dendritic spines in gray.

development (Schafer et al., 2012). In AD, reactivation of this pathway by Aβ deposits has been associated with synapse loss.

The complement cascade is composed of a large panel of mediators including C1q and C3 complex proteins which can be activated by three different pathways, all of which are capable of triggering phagocytosis (Stephan et al., 2012). In the CNS, complement proteins are expressed in neurons and glial cells, although microglia and astrocytes are the major sources of complement. Particularly, microglia expressed high level of C1q and CR3 (Veerhuis et al., 2011) and microglial CR3 have been shown to be crucial in synapse pruning during development (Schafer et al., 2012).

In AD context, patients showed elevated CSF concentrations of C3 and CR1, pointing out an alteration of complement system in the pathology (Daborg et al., 2012). The complement has been associated with Aβ but it is not clear whether it is protective or detrimental. Indeed, some studies reported that complement inhibition or deficiency results in accelerated amyloid pathology (Wyss-Coray et al., 2002; Maier et al., 2008) and that C3 along with CR3 contribute to Aβ phagocytosis (Fu et al., 2012). On the other hand, other studies pointed out that elimination and modulation of microglial CR3 decrease Aβ level (Czirr et al., 2017) and C3 antagonist ameliorates plaque load (Lian et al., 2016). Further studies are thus required to better understand the role of complement in Aβ pathology.

As AD is marked by an important synapse loss, questions have been raised on whether the complement could mediate such synapse elimination. Fonseca et al. (2004) demonstrated

that C1q deficiency in an AD mouse model partly restores synapse integrity pointing out a role of the complement system in AD. More recently, works from Hong et al. demonstrated that microglial C3/CR3 mediates synapse elimination when challenged with oligomeric Aβ (Hong et al., 2016). More specifically, they found that C1q is upregulated into synapse early in J20 mice and that Aβ oligomers increase C1q and microglia phagocytic activity. This resulted in synapse elimination by microglia, a process which is lost in CR3 KO mice. This study proposes a model in which C1q and oligomer Aβ would activate the complement cascade to drive synapse elimination through microglial CR3.

Eat Me and Eat Myself

Autophagy and phagocytosis are cellular degradation processes, necessary to degrade additional or damaged particles in lysosomes. These processes, ensured by a large enzymatic degradation system, are dysregulated during aging and are of particular importance during AD, as shown with the autophagy failure and the increase of autophagosomes in AD patients (Nixon et al., 2005). Moreover, lysosomal acidification and autophagy are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutation (Lee et al., 2010). Numerous studies demonstrate that microglial Aβ phagocytosis contribute to degeneration by triggering NLRP3 and lysosomal cathepsin-B that subsequently results in maturation and release of IL-1β (Halle et al., 2008). Cellular degradation processes could thus, by differently modulating the inflammasome, present opposite effects. It could be protective in normal physiological states and during the premature state of the pathology, and detrimental during chronic and late phases of diseases.

LOSS OF HOMEOSTATIC FUNCTIONS IN REACTIVE MICROGLIA

Although the majority of the studies concentrate on the microglial reactivity-acquired functions and assess their contribution to neurodegeneration, loss of key homeostatic functions may also be detrimental to neuronal functions and may contribute to the detrimental effects of microglia reaction. In the following part, we are reviewing few key microglial functions that are compromised in AD (**Figure 1**, bottom part).

Consequences of CX3CL1/CX3CR1 Signaling Loss in AD

In brain, the CX3CR1 receptor is predominantly expressed in microglia. Its ligand is the secreted soluble form of fractalkine, also named CX3CL1, and is constitutively expressed by neurons. CX3CL1 exerts an inhibitory signal, maintaining microglia in a resting state. CX3CL1-CX3CR1 is a critical signaling pathway during development as shown by the delay of glutamatergic synapse maturation (Paolicelli et al., 2011; Hoshiko et al., 2012) and functional consequences in adult synapses (Basilico et al., 2019) in CX3CR1$^{-/-}$ mice. Age is also a decisive factor in the regulation of CX3CR1 expression as LPS challenge is responsible for a more pronounced impairment of CX3CR1 expression in aged compared to young rats (Lyons et al., 2009).

The roles of CX3CL1/CX3CR1 communication during neuroinflammation are still subject to debate since CX3CR1 deletion effects differ depending on the challenge. In CX3CR1$^{-/-}$ mice and in both PD and ALS models, Cardona et al. (2006) demonstrated an extensive neuronal loss due to an alteration of cytokines production. CX3CR1 decrease is also observed in AD models. In neurodegenerative conditions, this disruption is associated with a strong microglial toxicity and an aggravation of the pathology (Keren-Shaul et al., 2017). The involvement of the CX3CL1/CX3CR1 signaling pathway in AD is confirmed by an increase in the plasmatic concentration of CX3CL1 in AD and MCI patients compared to healthy control subjects (Kim et al., 2008). However, the role of this pathway might be more complex as CX3CR1 deletion was shown to prevent neuronal loss in 3 × Tg AD mice (Fuhrmann et al., 2010) but worsen cellular and behavioral deficits in hAPP-J20 mice (Cho et al., 2011).

All these data point out to critical roles for CX3CL1–CX3CR1 signaling during neurodegenerative diseases, including AD, but also demonstrate that its complex spectrum of responses may depend on the genetic model of the disease.

The Yet Unresolved Role of P2Y12 Down-Regulation in AD

In physiological conditions, P2Y12 receptor is involved in chemotaxis and mice lacking this receptor showed altered microglia migration and polarization (Haynes et al., 2006). *P2ry12* was identified as a unique microglia gene in the CNS (Butovsky et al., 2014). It is one of the most highly expressed genes in microglia and is downregulated in reactive microglia (Haynes et al., 2006). Consequently, *P2ry12* gene expression levels have been proposed to be a marker of the homeostatic microglial signature (Butovsky et al., 2014). In agreement, in AD transgenic mouse model, microglia located at proximity of amyloid plaques do not express P2Y12R whereas the receptor is observed in plaque-distant ones (Butovsky et al., 2014; Jay et al., 2015). Similar findings have also been reported in human AD patients (Sanchez-Mejias et al., 2016; Mildner et al., 2017). However, so far, the consequences of this down-regulation for microglia functions are unknown and merit further attention.

MOST STUDIED MICROGLIAL MOLECULAR TARGETS IN AD

In the past years, genome-wide association studies (GWAS) identified over 25 genetic loci that robustly associate with risk of late onset Alzheimer disease (LOAD); many of these, relate to neuroinflammation and are preferentially or exclusively expressed in microglial cells, implicating microglia

reaction as not only a consequence of Alzheimer's but likely also a cause. In this section, we are reviewing the current knowledge regarding the roles of the most studied genes in this context.

APOE: Beyond Aβ Modulation, a Microglia-Function Modifier

The ε4 isoform of the Apolipoprotein E (APOE) represents a common genetic variant associated with AD and is the most significant known risk factor. APOE is an apolipoprotein implicated in cholesterol and lipid transfer between cells. In the brain, it is produced mainly by astrocytes, but also by microglia and to a lesser extent by neurons. In humans, APOE is found in three main isoforms: ε2, ε3, and ε4. The APOE-ε4 isoform represents the most significant risk factor for LOAD: the presence of one APOE-ε4 copy increases the risk of developing LOAD by three-fold whereas two APOE-ε4 copies lead to a nine-fold increase (Corder et al., 1993). On the opposite, individuals carrying the rare ε2 variant are less likely to develop AD and the most common APOE-ε3 isoform is thought to be neutral (Serrano-Pozo et al., 2015). How APOE isoforms affect the onset and development of AD remains unclear. Based on the early-described interaction between APOE and Aβ, studies mainly focused on the effects of APOE on amyloid load and oligomerization, which was shown to be isoforms-dependent (Strittmatter et al., 1993; Naslund et al., 1995; Hashimoto et al., 2012). Thus, APOE-ε4 patients have more Aβ plaques and oligomers than ε3 carriers (Schmechel et al., 1993; Tiraboschi et al., 2004; Hashimoto et al., 2012; Koffie et al., 2012), and mouse models expressing human APOE isoforms mimics the isoform-dependent modifications on Aβ deposits (Fagan et al., 2002; Hudry et al., 2013; Zhao et al., 2014). It was also reported that APOE can also influence Aβ clearance (DeMattos et al., 2004; Castellano et al., 2011), however, APOE-knockdown mice develop less Aβ deposits (Holtzman et al., 1999; Fagan et al., 2002).

Little is known regarding the microglial role of APOE. Early post-mortem studies in humans found a higher number of reactive microglia in APOE-ε4 carriers compared to APOE-ε3 (Egensperger et al., 1998), and recently Minett et al. (2016) found that APOE-ε4 allele was strongly associated with reactive microglia. Studies using mouse models expressing human isoforms also showed increased microgliosis in APOE-ε4 expressing mice compared to APOE-ε3 (Belinson and Michaelson, 2009; Rodriguez et al., 2014). Overall, these studies highlight a relation between APOE isoforms and reactive microglia. Evidences have also been pointing out a role of APOE in inflammatory processes (Lynch et al., 2001; Thangavel et al., 2017). Thus, APOE is up-regulated in disease-associated microglia (DAMs) and modulates transcription of homeostatic and inflammatory factors (Krasemann et al., 2017). Moreover, APOE modifies inflammatory response in an isoform manner; APOE-ε4 expressing mice releasing more pro-inflammatory cytokines than APOE-ε3 (Guo et al., 2004; Vitek et al., 2009; Zhu et al., 2012). However, the concept of APOE triggering more pro-inflammatory response has been challenged since APOE in the presence of Aβ can induce a decrease in pro-inflammatory cytokine release (Guo et al., 2004), indicating a more complex link between APOE, Aβ and glial cells. Overall, APOE is undoubtedly implicated in LOAD through Aβ aggregation and clearance but also by modulating microglia activation and cytokine release. However, additional studies are needed to explore these processes.

TREM2, the Well-Known Risk Factor With Unclarified Roles

Aside from APOE, the other major well-studied gene associated with LOAD is the Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). Indeed, GWAS studies identified several rare Trem2 gene variants associated with LOAD (Guerreiro et al., 2013; Jin et al., 2014). Among them, the rs75932628 variant, which causes the loss-of-function R47H mutation, showed significant association with AD and suggests a protective role for TREM2 activation pathway in AD (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). TREM2 is a cell surface receptor expressed in myeloid cells, including microglia (Schmid et al., 2002; Kiialainen et al., 2005) and was shown to modulate inflammation (Piccio et al., 2007), phagocytosis (Takahashi et al., 2005) and chemokine secretion (Bouchon et al., 2002; Sieber et al., 2013). How TREM2 affect AD is currently not well understood but TREM2 is increased in APP/PS1 hippocampus and cortices (Jiang et al., 2014) and its expression increases with age (Jay et al., 2015). Moreover, TREM2 expression is increased in plaque-associated microglia (Frank et al., 2008; Guerreiro et al., 2013), and modulating TREM2 expression can reprogram microglia response (Krasemann et al., 2017; Lee C.Y.D. et al., 2018). In particular, Keren-Shaul et al. demonstrated that TREM2 is required for a complete activation of DAMs (Keren-Shaul et al., 2017), pointing out a major role of TREM2 in those cells.

Most of the studies on TREM2 in AD relate to microglia-mediated Aβ phagocytosis, however, they do not all agree on whether it has beneficial or detrimental effects. Indeed, Ulrich et al. (2014) found no change in amyloid burden in 3-month-old TREM2-heterozygous APP-21 mice whereas Jay et al. (2015) showed reduced 6E10 staining in 4-month-old TREM2 deficient APP/PS1 mice. On the opposite, Wang et al. (2015) suggested using 8-month-old 5xFAD mice, that TREM2 deficiency would be detrimental as it increases hippocampal Aβ peptide. Similarly, Jiang et al. (2014) showed, *in vitro*, that TREM2 facilitates Aβ 1-42 phagocytosis and, *in vivo*, that TREM2 overexpression reduces plaque density in the cortex and hippocampus of APP/PS1 mice. Altogether, these different studies suggest a complex role of TREM2 on Aβ and suggest an age- or stage-dependent effect.

Contradictory results have also been found in TREM2-dependent inflammatory response. Jay et al. (2015) showed that TREM2 deficiency in APP/PS1 mice reduces the pro-inflammatory response. On the contrary, in *in vitro* studies, TREM2 overexpression was shown to reduce - while TREM2 deficiency increases - pro-inflammatory cytokine production (Takahashi et al., 2005; Jiang et al., 2014). Therefore, further studies are required to clarify how TREM2 influences inflammatory response.

Despite discrepancies found in TREM2 implication in inflammatory response and Aβ deposition, it is of agreement that TREM2 deficiency causes a decrease in Aβ-associated microglia (Jay et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2018). Altogether, those studies show TREM2 implication in AD by modulating inflammatory processes and Aβ deposition. Moreover, several studies found that Aβ binds to TREM2 and that this interaction can modulate microglia functions such as proliferation, Aβ degradation and inflammatory response (Zhong et al., 2018). Interestingly, a link between TREM2 and APOE has recently been highlighted suggesting that TREM2 modulates APOE expression and signaling (Krasemann et al., 2017; Parhizkar et al., 2019).

Many studies aim to decipher the role of TREM2 in AD. However, current studies mainly used TREM2 overexpression or knockout although it might be relevant to also study TREM2 variants.

Other AD Risk Factors

Alzheimer disease-related GWAS have identified many other microglia genes as potential risk factors in AD. This includes genes such as *Cd33*, *Cr1*, or *Abca7*, which have been implicated in phagocytosis (Villegas-Llerena et al., 2016). Additionally, CD33 was shown to inhibit Aβ clearance whereas CR1 is part of the complement pathway that helps eliminating Aβ plaques. Various SNPs of CD33 have been found: the rs3826656 and rs3865444 variants are associated with LOAD whereas the rs3865444 variant confers protection (McQuade and Blurton-Jones, 2019). Overall, more than 25 microglia genes have been highlighted by GWAS studies (Verheijen and Sleegers, 2018). Their contribution to AD pathogenesis is yet unknown and merit scientists' attention as they tend to be more common genetic variants.

EMERGING MICROGLIAL TARGETS IN AD

Emerging microglial targets are highlighted in **Figure 2**.

Purinergic Signaling

Of the many mechanisms implicated in microglial functions, purinergic signaling is one worth mentioning. Indeed, microglial purinergic receptors are known to modulate several processes including phagocytosis, chemotaxis and cytokine release (Abbracchio and Ceruti, 2007; Calovi et al., 2019). Purinergic receptors are divided into two super families: P1 receptors respond to adenosine whereas P2 respond to ADP and ATP. Purinergic receptors are widely expressed in several CNS cell types including microglia (Butovsky et al., 2014), and both ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors have been implicated in neurological diseases including AD (Burnstock, 2016).

Of the G protein-coupled P2Y receptors, P2Y6R, 12, and 13 are the three most investigated subtypes expressed in microglia (Calovi et al., 2019). In AD, the most studied is P2Y12 receptor which plays important role in homeostatic microglia and whose role is described above (see section "Loss of Homeostatic Functions in Reactive Microglia"). As for the other P2YRs, P2Y6R might be implicated in amyloid phagocytosis as Wendt et al. (2017) demonstrate an impaired P2Y6R-dependent phagocytosis mechanism in 9-month-old 5xFAD mice. Although P2Y2R expression in microglia seems very low (Calovi et al., 2019), studies have also investigate its implication in AD. *In vitro*, Aβ treatment of primary microglia induces an increase of P2Y2R expression and Aβ-treated P2Y2R$^{-/-}$ microglia showed loss of motility and altered ATP/UDP-triggered Aβ uptake (Kim et al., 2012) suggesting that P2Y2R up-regulation enhances microglia-dependent Aβ degradation. Interestingly, P2Y2R expression is up-regulated in 10 weeks old TgCRND8 AD mouse models and P2Y2R heterozygous mice showed accelerated pathology compared to wild-type mice (Ajit et al., 2014). In contradiction with data from the TgCRND8 mice but supporting the idea of P2Y2R displaying protective effect, data demonstrate a downregulation of P2Y2R in parietal cortex of AD patients (Lai et al., 2008). Discrepancies between mice and human P2Y2R expression regulation may be explained by the stage at which the studies were conducted. Altogether, these results suggest a protective role of P2Y2R signaling in the context of AD.

The other major P2 receptors are the ATP-gated ion channels P2X receptors. There are seven P2XR subunits whose assembly in trimers forms cation-permeable channels that are widely expressed in the CNS. To date, P2X4R and P2X7R are the only P2XRs pertinently characterized in microglia. P2X7 is the most studied in AD context because of its well-established pro-inflammatory role, being a key step in the NLRP3 inflammasome activation leading to IL-1β release (Bhattacharya and Biber, 2016; Adinolfi et al., 2018). P2X7R is up-regulated in AD patient brains (McLarnon et al., 2006; Martin et al., 2018) and administration of Aβ peptide in rat hippocampus increases P2X7R expression (McLarnon et al., 2006). Moreover, downregulating or blocking P2X7R decreases pro-inflammatory cytokines release in microglia cell cultures stimulated by ATP and Aβ (Ni et al., 2013). On the other hand, Martin et al. (2018) demonstrate that P2X7R deficiency ameliorates cognitive functions and reduces amyloid load without altering IL-1β level. This set of data suggest a pro-inflammatory role of P2X7R in AD. Lastly, the C489T polymorphism of P2X7R, which causes a loss of function, was found to be less frequent in AD patients, supporting a potential contribution of P2X7R in AD pathogenesis (Sanz et al., 2014).

Another highly expressed P2X receptor in reactive microglia is P2X4R. P2X4R are highly up-regulated upon microglia activation and have been implicated in neurological disorders and inflammatory processes (Suurväli et al., 2017). Although P2X4R is decreased in AD brain patients and neuronal P2X4R seems to modulate Aβ-induced neuronal death (Varma et al., 2009), no work has yet been performed on microglial P2X4R in AD.

The third main purinergic receptor family is that of adenosine P1Rs, which comprises A1, A2a, A2B, and A3 receptors. P1R are G protein-coupled receptors abundantly expressed in the CNS and all P1 subtypes are expressed in microglia. A1 and A2a receptor expressions have been found to be dysregulated in post-mortem tissues from AD patients (Erb et al., 2018), thus suggesting that P1 receptors might be implicated in AD. However, to date, not much is

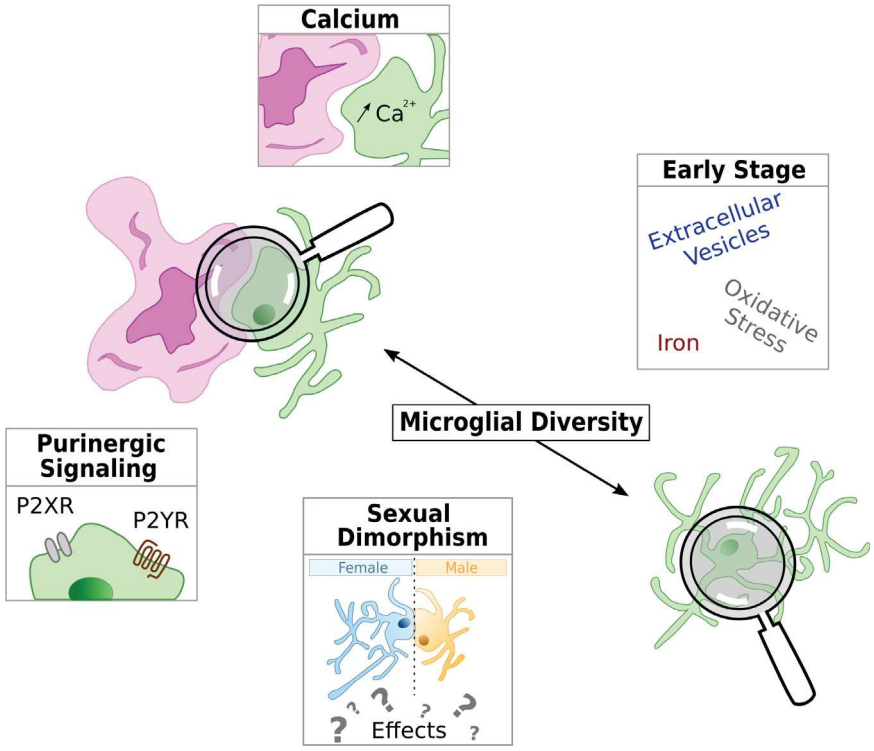


FIGURE 2 | Schematic representation of the current hot topics and emerging microglial targets in AD physiopathology studied in this review. Microglia is represented in green and either with a reactive shape associated to amyloid-β deposit in purple or in the parenchyma with an homeostatic shape, away from Aβ.

known regarding the contribution of microglial P1 signaling in the context of AD.

Overall, those few studies suggest the implication of microglia purinergic receptors in AD through different processes such as inflammation or phagocytosis. However, since purinergic receptors are expressed in all neural cell types incriminated in AD, more specific tools such as cell-specific KO models are required to decipher the roles of microglial purinergic signaling.

Microglial Calcium Signaling, a Poorly Studied Messenger in AD

Calcium signaling is a key second messenger in almost all cell type and is essential for the normal CNS functioning. Many microglia functions are mediated by Ca^{2+} (McLarnon, 2005; Färber and Kettenmann, 2006). In particular, microglia reaction is accompanied with intracellular calcium increase, a process that is required to induce cytokines and chemokines release (Hoffmann et al., 2003).

Calcium signaling dysregulation in AD has been widely studied in neurons (Tong et al., 2018), but very little is known about calcium signaling in microglia in the context of AD. In an early study, Combs et al. (1999) demonstrated that stimulation of cultured microglia with $A\beta_{25-35}$ peptide results in a transient increase in intracellular $[Ca^{2+}]$. This calcium is released from intracellular store and leads to microglia activation and neurotoxic factors production. More recently, McLarnon et al. showed that cultured microglia from AD patients have higher basal Ca^{2+} level but lower amplitude and longer-lasting ATP-induced calcium response with respect to that measured in microglia from non-demented individuals, thus suggesting that calcium signaling is impaired in microglia from AD patients (McLarnon et al., 2005).

Altered P2YR-dependent calcium signaling has been observed in plaque-associated microglia in AD mouse models whereas plaque-distant microglia showed similar Ca^{2+} activity than matched controls (Brawek et al., 2014). As calcium mediates many microglial functions, it might be interesting to further investigate microglia calcium signaling in the context of AD. Particularly since some purinergic receptors are likely implicated in AD, it might be worth studying whether calcium signaling dysregulation involves purinergic signaling impairment.

MICROGLIA IN ALZHEIMER DISEASE: CURRENT HOT TOPICS

The involvement of microglia in AD is a relatively new area of research, but it is growing at a fast pace. In addition to the pathways described above, new areas of investigation are emerging or revisited based on our current knowledge of microglial functions. In the following part, we highlight few current hot topics (**Figure 2**). These new areas of research will help to increase our understanding of AD pathogenesis, and may,

on a longer term, help to better stratify the patients and to design tailored therapeutic strategies.

Sexual Dimorphism, a Key Factor to Design Efficient Therapeutic Strategies

The impact of sexual dimorphism in biology is a hot topic, and AD research makes no exception. Indeed, AD prevalence is two-fold higher in women (Hebert et al., 2013), and women suffering from AD display specific cognitive alterations, biomarker patterns or risk factors susceptibility (Ferretti et al., 2018). This sex effect was, at first, thought to be due to higher longevity but recent reports show that it is clearly not the only explanation (Viña and Lloret, 2010). The involvement of sex is still a subject of intense debate and biological mechanisms involved in human pathology are still controversial. Because most AD pre-clinical studies use either males or females, but rarely both, the cellular and molecular mechanisms involved in AD sexual dimorphism are still poorly understood. Yet, the few studies comparing the influence of sexual dimorphism in AD mouse models, all agree on a sooner precocious and stronger AD phenotype in females (**Table 1**). Sex-based effects are observed in different AD mouse models, both at behavioral and histological levels. Globally, cognitive alterations in females appear at younger ages and remain stronger than in males (Clinton et al., 2007; Carroll et al., 2010; Gallagher et al., 2013; Yang et al., 2018). Whatever brain areas, models and ages, females display more amyloid plaques and higher amount of soluble Aβ (Wang et al., 2003; Carroll et al., 2010; Gallagher et al., 2013; Ben Haim et al., 2015; Janus et al., 2015; Jiao et al., 2016; Yang et al., 2018). Furthermore, in late stages, Tau phosphorylation levels and number of Phospho-Tau positive cells are higher in females (Clinton et al., 2007). Synaptic and neuronal degeneration processes seem also to be stronger in aged females (Jiao et al., 2016). Relative to neuroinflammation, glial cells from old female AD mice present stronger reactive states compared to males and are associated with higher levels of pro-inflammatory factors (Jiao et al., 2016; Yang et al., 2018). While sex effects are clearly established in both AD mice and patients, it remains unknown whether these modifications are due to systemic/hormonal effects or whether it also exists at the cellular level.

A growing number of studies highlights the impact of sexual dimorphism on microglia shape and functions (**Table 2**). Many sex mediated effects on microglia have been demonstrated. They seem to be highly dependent on age and brain region: (1) in both mice and rats, adult males show higher microglia densities (Guneykaya et al., 2018; Perkins et al., 2018); (2) adult females microglia also display higher proportion of cells with long and thick processes while male microglia have larger soma (Schwarz et al., 2012; Guneykaya et al., 2018; Weinhard et al., 2018). These differences may indicate that adult female microglia are in a more homeostatic state while males display a more reactive state. Functional differences are also observed, with microglia from male brain displaying higher migration rates while female's present stronger phagocytic activity related to higher expression of phagocytosis associated genes (Nelson et al., 2017; Yanguas-Casás et al., 2018). RNA sequencing also revealed a more protective transcriptomic profile for female microglia while male microglia displayed a more inflammatory phenotype (Villa et al., 2018). A recent study also reports a sex impact on microglial electrical properties, suggesting that sex may affect microglia secretory profile, a property that can directly influence inflammatory response abilities (Guneykaya et al., 2018). It was initially thought that microglia sex differences depend from circulating sexual hormones (Nissen, 2017), but this view was recently challenged as it was shown that female microglia retain their protective properties when transplanted in males brain (Villa et al., 2018).

Thus, although the molecular pathways involved in this microglial sexualization remain largely unknown, the current data suggest that, at least in adulthood, female microglia are in a more homeostatic and protective state. In the context of AD, it could be speculated that female microglia committed to homeostatic functions would need longer time exposure or stronger stimuli to polarize their shape and functions to answer correctly to harmful stimuli. Additionally, when they finally react to Aβ, they will change their local environment from a low- to a high-inflammatory environment. This drastic change could lead to more harmful effects on microglia themselves but also on all other surrounding cells and may explain why female are more likely to develop the pathology.

Although the effect of sex on microglial functions has been implicated in various CNS pathologies (Sorge et al., 2015; Charriaut-Marlangue et al., 2018; Jullienne et al., 2018; Mapplebeck et al., 2018; Thion et al., 2018), further studies are needed to understand the impact of microglial sexual dimorphism in AD initiation and progression and to which extend it relies to sex disbalance in AD. Whether sexual dimorphism mechanisms are similar in human and animal models also need to be clarified.

Microglial Diversity Is Both a Challenge and an Opportunity

Microglia cell diversity has been recognized since their first description by Pio del Rio-Hortega in 1919 (Sierra et al., 2016), who reported the existence of different morphological microglia phenotypes in the human brain. He also established that microglia morphology is considerably altered in disease conditions, introducing the concept that microglia tightly adapt to their local environment. More recent functional, morphological, immunohistochemical, and medium throughput analyses of microglia in pathological conditions also pointed out to the existence of a diversity of reactive phenotypes (Hanisch and Ketternmann, 2007; Ransohoff and Perry, 2009; Kierdorf and Prinz, 2017). In this respect, several semi-automated tools are now available to enable the identification of phenotypically distinct microglial cell subpopulations (Wagner et al., 2013; Verdonk et al., 2016; Salamanca et al., 2019).

In the last decade, the development of high throughput transcriptomic approaches combined with improved cell purification techniques helped refine our understanding of the molecular diversity of microglia both in physiological (Grabert et al., 2016) and pathophysiological conditions (Hirbec et al.,

TABLE 1 | Impact of sexual dimorphism on AD pathophyiology in various mice models.

AD mice model	Age	Brain area	Studied parameter (readout)	Sex influence	References
Behavior studies					
3xTg	6–9 mo	–	MWM learning deficit	♀ only	Clinton et al., 2007
	15mo	–	MWM learning deficit	♀ = ♂	Clinton et al., 2007
	2–6–9–15mo	–	NOR	♀ = ♂	Clinton et al., 2007
	12mo	–	MWM retention task	♀ < ♂	Yang et al., 2018
	12–14mo	–	Spontaneous alternation	♀ < ♂	Carroll et al., 2010
Amyloid beta cascade					
3xTg	2–6–12–15mo	Brain homogenate	Aβ 40/42 soluble and insoluble fractions (ELISA)	♀ = ♂	Clinton et al., 2007
	6–8mo	PFCx	Plaques density (Aβ antibody)	♀ > ♂	Carroll et al., 2010
	12mo	SB, CA1, PFCx	Plaques density (Aβ antibody)	♀ > ♂	Carroll et al., 2010
	12mo	HC	Aβ positive area (6E10 staining)	♀ > ♂	Yang et al., 2018
APP(swe)/PS1(de9)	4–12–17mo	HC	Aβ 40/42 (ELISA)	♀ > ♂	Wang et al., 2003
	12–17mo	HC	Plaque area and density (W0–2 staining)	♀ > ♂	Wang et al., 2003
	?	HC, Cx	Plaque density (Congo Red staining)	♀ > ♂	Gallagher et al., 2013
	?	Brain homogenate	Insoluble Aβ42 (ELISA)	♀ > ♂	Gallagher et al., 2013
	?	Brain homogenate	Soluble Aβ42 (ELISA)	♀ = ♂	Gallagher et al., 2013
	?	Brain homogenate	*Ide* (mRNA expression)	♂ > ♀	Gallagher et al., 2013
	?	Brain homogenate	*Bace-1* (mRNA expression)	♀ > ♂	Gallagher et al., 2013
	12mo	OB, HC, NC	Plaque area and density (Congo red compared to Thioflavin-S and 6E10 staining)	♀ > ♂	Jiao et al., 2016
	12mo	Brain homogenate	Aβ 40/42 (Western Blot and ELISA)	♀ > ♂	Jiao et al., 2016
	18mo	HC, Cx	Plaque area (Campbell-Switzer Silver staining)	♀ > ♂	Janus et al., 2015
Tau load					
3xTg	6mo	HC	Tau positive region (HT7 antibody)	♀ = ♂	Clinton et al., 2007
	12mo	HC	Number of P-Tau positive neurons and P-Tau area (pT231-Tau antibody)	♀ > ♂	Yang et al., 2018
APPswe/PS1de9	12mo	CA1, CA3, NC	P-Tau positive area (IHC) and P-Tau quantity (WB)	♀ > ♂	Jiao et al., 2016
Inflammation					
3xTg	12mo	HC	IBA1 and GFAP positive area	♀ > ♂	Yang et al., 2018
APPswe/PS1de9	12mo	Brain homogenate	TNF, IFN and Il-1β protein levels (ELISA)	♀ > ♂	Jiao et al., 2016
	12mo	OB, HC, NC	IBA1 and GFAP positive area	♀ > ♂	Jiao et al., 2016
	12mo	HC, NC	Caspase-3 positive neurons	♀ > ♂	Jiao et al., 2016
Neurodegeneration					
APPswe/PS1de9	12mo	CA1, CA3, NC	Number of neurons	♂ > ♀	Jiao et al., 2016
	12mo	Brain homogenate	Synaptic proteins expression level	♂ > ♀	Jiao et al., 2016
	10mo	Whole Brain	White matter, axonal and myelinated fibers volumes	♀ > ♂	Zhou et al., 2018
Comorbidity					
APPswe/PS1de9	12mo	Whole Brain	Microhemorrage number	♀ > ♂	Jiao et al., 2016

This table is a non exhaustive compilation of the literature concerning AD sexual dimorphism. NC for Neocortex, PFCx for PreFrontalCortex, HC for Hippocampus, SB for Subiculum, OB for Olfactory Bulb, MWM for Morris Water Maze, IDE for Insulin Degrading Enzyme, ? for missing data.

2017; Holtman et al., 2017; Sousa et al., 2017; Dubbelaar et al., 2018). They established that microglia cannot be categorized in a discrete number of physiological and pathological states. However, the breakthrough in the appreciation of the microglia diversity arose from the emergence of single-cell high throughput approaches. In particular single-cell RNAseq (scRNA-seq)

TABLE 2 | Impact of sexual dimorphism on microglial shape and function.

Parameter	Read out	Brain area/cellular model	Age	Sex influence	References
Microglia density					
Microglia density	IBA1 positive cells	Hippocampus	P21	♂ > ♀	Guneykaya et al., 2018
		Amygdala	P21	♀ > ♂	
		Cx, HC, and Amygdala	13w	♂ > ♀	
		HC, Amygdala, and Striatum	3mo	♂ > ♀	Perkins et al., 2018
Shape					
Microglial compartment volume	IBA1 and CD68 staining	CA1	P8	♀ > ♂	Weinhard et al., 2018
			P28	♂ > ♀	
	Soma size	Cx, HC, and Amygdala	13w	♂ > ♀	Guneykaya et al., 2018
Microglia ramification complexicity	IBA1 positive cells: Ameboid	CA3, Dentate Gyrus, and Amygdala	P0	♀ > ♂	Schwarz et al., 2012
		CA1, CA3, Dentate Gyrus, Parietal Cortex, and Amygdala	P4	♂ > ♀	
	IBA1 positive cells: Ramified (thick and long processes)	CA3, Dentate Gyrus, Parietal Cortex, and Amygdala	P30 and P60	♀ > ♂	
Function					
Cell migration	Transwell migration	Primary microglia culture	P0 to P2	♂ > ♀	Yanguas-Casás et al., 2018
Phagocytosis	Phagocytic cup (CD68+, Dapi+)	HC	Neo-natal	♀ > ♂	Nelson et al., 2017
	Latex beads	Acute cortical and hippocampal slices	13w	♀ = ♂	Guneykaya et al., 2018
	Fluorescent beads	Primary microglia culture	P0 to P2	♀ > ♂	Yanguas-Casás et al., 2018
Electrophysiological properties	Baseline inward and outward conductance	Microglia located in layers 2–6 of the somatosensory cortex in acute slices	N/A	♂ > ♀	Guneykaya et al., 2018
	Resting membrane potential		N/A	♂ > ♀	
Inflammatory profile (protein level)	Il-10	Cx and HC	P60	♀ = ♂	Schwarz et al., 2012
	Il-1b	Cx and HC	P60	♀ > ♂	
Inflammatory profile. (gene expression)	Il-10, Il1r1, Il1f1 genes	Cx and HC	P0, P4, P60	♀ > ♂	Schwarz et al., 2012
	RNASeq	Isolated microglia	3mo	♀: protective ♂: Inflammatory	Villa et al., 2018

This table is a non exhaustive compilation of the literature concerning microglial sexual dimorphism. Cx for Cortex, HC for Hippocampus, N/A for missing data.

enables investigating the diversity at cellular resolution and allows a detailed examination of cell states diversity and changes that are reflective of those *in vivo* (Macosko et al., 2015).

Two very recent scRNA-seq studies established the spatial and temporal diversity of microglia during the mouse development, and in either neurodegenerative or inflammatory conditions (Hammond et al., 2019; Masuda et al., 2019). These studies, together with more focused previous ones, (Keren-Shaul et al., 2017; Friedman et al., 2018) established that different microglia subpopulations co-exist at a given physiological or pathological state. Such heterogeneity within the microglia cell population represents both a challenge and an opportunity: the existence of distinct subpopulations supports the design of specific treatments targeting specific subpopulations with the aims of either promoting the beneficial subpopulations and/or hampering the deleterious ones.

What about microglia diversity in AD? It is known for years that AD brains exhibit at least two very distinct morphological microglia phenotypes: cells associated to the amyloid plaques display a "reactive"/amoeboid-like phenotype whereas those present in the rest of the parenchyma have a homeostatic-like morphology (Krabbe et al., 2013). As a mark of the importance of this diversity, it was shown that transcripts up-regulated in microglia isolated from AD mice were more highly expressed

in tissues isolated in the vicinity of amyloid plaques compared to those distant from plaques (Orre et al., 2014). This suggested that microglia associated to plaques activate specific signaling pathways and functions. Using scRNA-seq of sorted 5xFAD mouse brain immune cells, Keren-Shaul et al. (2017) identified three distinct subtypes of microglia, including DAMs whose relative abundance increases with disease progression and which are preferentially located around amyloid plaques. The translational relevance of the DAMs was confirmed in human postmortem brains in which specific DAM markers are expressed in a subset of microglia in AD patients, but not in control subjects. More recently, in the knock-in APP^{NLFG} AD mouse model (Saito et al., 2014; Sala Frigerio et al., 2019) identified activated- and interferon response microglia (ARM and IRM, respectively). ARMs partly overlap with DAMs, but by applying cell trajectory inference methods, these last authors demonstrated that ARMs were not solely present in disease conditions and are part of the normal brain aging process. However, many unresolved questions remain regarding the functional significance of this diversity. In particular, when it arises during AD progression and whether it is already present at the prodromal stages of the disease. With progress of both technology and analytic methods, it is now feasible to get a deeper understanding of the microglia diversity across AD progression. Identification of specific, potentially small in size, microglia subpopulations may have important implications for translational applications. Identification of factors released by these subpopulations and that can diffuse to the CSF may lead to the identification of new biomarkers. Additionally, identification of specific subpopulations will help discover new pathways and functions that contribute to the disease progression and may lead to the development of more specific functional positron emission tomography (PET) tracers. Deciphering, whether these subpopulations have beneficial, neutral or detrimental effects on brain cells, including neurons, will open the way for the design innovative disease-modifying therapeutic strategies.

Studying AD at Early Stages to Identify Early Biomarkers

After years of unsuccessful clinical trials, scientists are now realizing that AD is a pathology we may want to prevent (or stop) rather than to cure. This is calling for the identification of early diagnostic biomarkers, which are sorely lacking to help prodromal diagnostic, or design innovative disease-modifying therapeutic strategies. Although AD early stages are still less studied, increasing number of studies are now focusing on the prodromal phases to unravel early dysregulations.

Because one of microglia's main role is to sense their environment and to react to danger, they are likely to play key roles in initial brain response to AD-driven changes. In agreement, a recent PET and magnetic resonance imaging (MRI) based study showed that AD patients have a first microglial activation peak before they display any other hallmarks of the pathology, suggesting that microglial dysfunction is critically involved in AD initiation (Fan et al., 2017). The involvement of microglia in AD initiation stages raises the question of which microglial targets could be modulated at an early stage to slow down the progression of the disease.

Extracellular vesicles (EVs) are a family of small membrane vesicles, which includes exosomes and microvesicles (MVs), transporting various types of molecules. In the recent years, EVs have emerged as a new mean of communication between cells. Microglia abilities to secrete EVs and MVs are part of their essential inflammatory functions. In the Aβ phagocytosis process, overloaded microglia can release Aβ-containing small secretory vesicles (Joshi et al., 2014), as well as Tau or P-Tau through exosomes (Saman et al., 2012; Asai et al., 2015). Accordingly, the levels of myeloid MVs detected in the CSF of MCI or early stage AD patients, is correlated with the extent of their white matter damage (Agosta et al., 2014). Microglial EVs may thus be regarded as a possible mean to spread the pathology during early stages. Interestingly, because they are secreted and can access first the CSF compartment and then the blood, microglial EVs may represent valuable diagnosis tools (Trotta et al., 2018).

Oxidative stress is known as a necessary but potentially harmful process. In response to fibrillary Aβ, reactive microglia produce free radicals, notably superoxide via the NADPH oxidase (NOX) (Harrigan et al., 2008). Moreover, NOX activity is increased in MCI patients compared to controls (Bruce-Keller et al., 2010). These findings open the way for using NOX activity as the marker of early microglia reaction in AD. Interfering with NOX activity through specific compounds may also provide a mean to slow down the pathology (Dumont and Beal, 2011).

Iron is an important metal implicated in vital biological processes. However, intracellular iron overload can lead to neuronal degeneration (Zhang et al., 2014). Microglia are able to interact, transport and metabolize iron. When they secrete pro-inflammatory factors, microglia can stimulate neuronal iron uptake leading to an increase in neurodegeneration (Zhang et al., 2014). Interestingly, patients with specific iron overload disorder are subject to earlier onset of AD, suggesting that iron may be involved in the initiation steps of the pathology. Moreover, iron chelation seems to be beneficial to AD patients. Further work is needed to understand the early implication of microglial iron regulations in AD (Nnah and Wessling-Resnick, 2018).

BARRIERS TO DISCOVERIES

Although fundamental knowledge is of importance, the ultimate goal of characterizing cells functions and dysfunctions in physiological and pathological conditions is to design efficient therapeutic strategies with clinical benefit. Understanding the complexity of Alzheimer's disease is one of the XXIth century challenges. To do so we mainly rely on animal models that mimic the symptoms of the pathology (amyloid deposits, hyperphosphorylated tau, cognitive alterations, etc.). However, so far, the results generated from these models have generally failed to translate to clinic, and only symptomatic and poorly efficient treatments exist (Ransohoff, 2018). In the two following paragraphs, we explore two important factors that may have been under-estimated in AD pre-clinical research: the relevance of current AD mouse models and the immunological differences

between mice and humans. These remarks do not only apply to the study of microglia' roles in AD, but are important issues to consider for the design of any preclinical studies.

Are the Current Mouse Models Tailored to Understand AD and Identify Drug Targets?

Most of the animal models are genetically engineered to overexpress human protein mutations also leading to an overexpression of their respective by-products, thus generating potential confounding factors (Sasaguri et al., 2017). In addition, most AD models are based on familial mutations whereas early-onset familial AD is estimated to account for only 3.5% of total AD cases (Harvey et al., 2003). In addition, some of these models are based on a combination of mutations that were never found in patients. Because it is the first hallmark of AD, most of the models focused on the amyloidogenic pathway (Sasaguri et al., 2017). However, it is clear that, in humans, there is a concomitant effect of Aβ and P-Tau. To solve this issue, the 3x-Tg model is combining Aβ and Tau associated features. However, it only poorly represents the pathology in term of kinetic of appearance of the symptoms as cognitive deficits appear way too early and before any amyloid accumulation or Tau dysregulation (AlzForum[1]). To solve these issues, new mouse-based or human-based models are created (see section "New opportunities in AD research").

To study microglia impact on AD, new models have been created by combining microglial dedicated tools with AD models (Zhou et al., 2018). One of the most commonly used models is the $CX3CR1^{+/eGFP}$ x APP/PS1 strain, in which an allele of the fractalkine receptor CX3CR1 is replaced by a GFP allowing to track microglial cells. However, to our knowledge, the impact of the CX3CR1 haplo-deficiency on AD development has not yet been thoroughly investigated. Finally, AD studies are generally conducted in old mice, when the pathology symptoms and hallmarks are well established. This stage of the pathology is probably too advanced for the identification of efficient disease modifying drugs.

Human and Mice Are Not Immunologically Similar

In the field of inflammation, the comprehensive study by Seok et al. (2013) revealed that gene dysregulation in mouse models of severe human inflammatory conditions (endotoxemia, burns, and trauma) do not correlate with human genomic changes. This raises the question of the relevance of mouse models to study the role of immune cells in diseases, including brain disease. Several factors known to be of importance for immune functions differ between rodents and human studies. Most often, rodent models and studies use inbred strains whereas human genetic backgrounds are much more diverse. Additionally, humans are exposed to multiple diseases whereas research mouse models are raised in tightly controlled environment (Davis, 2012).

Functional studies investigated the response of human microglia to either endogenous (i.e., M-CSF) or exogenous (i.e., LPS) stimuli (Melief et al., 2012; Smith et al., 2013). For the most part, they show comparable results with mouse analyses, thus agreeing with two comprehensive transcriptomic studies which compared gene expression profiles in human and mouse microglia and concluded that, overall, gene expression is very similar in the two species (Galatro et al., 2017; Gosselin et al., 2017). Of interest to brain diseases, a good correlation between human and mouse microglia in response to neurodegeneration was also observed by other authors (Holtman et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017).

However, notwithstanding their global resemblance, significant number of genes are differentially expressed in mouse and human microglia. In particular, specific immune genes are only expressed in human samples (Gosselin et al., 2017). In addition, differences in the relative expression of lineage- and signal-dependent transcription factors between mice and humans were observed (Holtman et al., 2017). In line, previous studies identified several molecular pathways and signaling functions that significantly differ between mouse and human microglia. This includes proliferation, response to TGFβ1, Siglecs signaling, nitric oxide (NO) production, and response to certain drugs such as valproic acid (VPA) (Smith and Dragunow, 2014).

Of relevance to AD, Siglec-3 (CD33) that has been identified as a risk factor for AD (Bertram et al., 2008) displays substantial species differences in expression patterns and ligand recognition (Lajaunias et al., 2005). Additionally, age-related changes of immune and cognitive functions may not be correctly modeled in rodents, whose life expectancy is far less compared to humans. Accordingly, gene expression changes in aged human brain are significantly different from those in the mouse brain (Loerch et al., 2008; Bishop et al., 2010). In agreement, Galatro et al. (2017) revealed that there is a limited overlap in age-related changes in human and mouse microglia, highlighting that data obtained in aged mice should be extrapolated to the human situation with caution. Translation of results from mice to humans is also hampered by the lack of tools to precisely characterize microglial reactivity in patients: TSPO binding is so far the only way to study microglia reaction in a clinical context.

Although methods to purify, culture and experiment on human microglia have been established, access to human samples that meet the requirements of high-quality studies is limited. AD mouse models are thus undoubtedly useful to decipher the roles of specific microglial functions and signaling pathways. However, the species differences highlighted above should prompt scientists to confirm the results they obtained in mouse models on human samples.

NEW OPPORTUNITIES IN AD RESEARCH

While current models to study AD have multiple limitations, scientists are trying to generate new models with limited pitfalls. In this last part, we are reviewing new approaches currently

[1]https://www.alzforum.org/

developed. These approaches are expected to improve our knowledge on microglial functions and help bridge the gap between *in vitro* studies, rodent models and the human disease.

Promising Animal Models to Overcome Identified Pitfalls

Although mouse models present significant pitfalls, they are attractive models in preclinical studies. Indeed, they are small, easy to raise, mammals with reasonable life expectancy. They reproduce well in captivity and can be engineered and/or humanized in a relatively easy way. Furthermore, with the exponential development of a wide repertoire of mouse lines (Model Organism Development and Evaluation for Late-Onset Alzheimer's Disease[2]), it is possible for scientists to explore new hypotheses by combining different mouse lines. In this context and to overcome the problems associated with APP overexpression, Drs Saito and Saido developed new knock-in AD mouse models, namely the APP^{NLF} and APP^{NLFG} mice (Saito et al., 2014). In these models, mutated APP is expressed from its endogenous promoter, leading to a kinetic of appearance of the symptoms which is more comparable with human pathology (Sakakibara et al., 2018). These models are not thoroughly characterized yet and still excludes Tau-associated dysfunctions. However, in the APP^{NLF} model, the delay before Aβ deposits appearance supports that it may represent an interesting model to study the prodromal phase of the disease.

Other models, not based on genetic modifications, have also emerged in the last decades. Compared to humans, dogs share an almost identical enzymatic machinery to process APP. Moreover, they may naturally develop an age-related cognitive dysfunction that reproduces several aspects of AD (Schmidt et al., 2015). With its high life span, the canine model can be useful specifically to study pathways involved in Aβ deposition and clearance in the early phases of the disease (Sarasa and Pesini, 2009). To get closer to human pathology, several primate models are currently used to study AD. Depending on their phylogenetic distance to humans, they neither display the same kinetic nor kind of neurological alterations (Heuer et al., 2012). Among primates, *Microcebus Murinus* also known as the gray mouse lemur, is particularly interesting (Bons et al., 2006). Indeed, they are small animals, just over the size of a mouse. They can be raised in cohorts of several individuals, and can reproduce in captivity. Along aging some individuals naturally develop an AD like pathology with Aβ plaques (Mestre-Francés et al., 2000), associated with specific transcriptomic remodeling (Abdel Rassoul et al., 2010). Histological features also seem to be associated with cognitive alterations (Trouche et al., 2010). Although we know that, at least in the spinal cord, the gray mouse lemur microglial shape and distribution is closer to human compared to mouse (Le Corre et al., 2018), microglia are still poorly studied in this model. Further studies are needed to investigate the involvement of microglia in this age-related AD like pathology.

Although, both dog and primate models represent interesting models, they are not so easy to use. For example, there are only few breeding centers for *Microcebus Murinus* worldwide. Those animals also need more housing space and their use is subjected to drastic ethic rules. Moreover, many of the research tools are designed on mouse genome/proteins limiting the use of these peculiar models.

[2]https://model-ad.org

hiPSCs-Derived Microglia: An Emerging Tool to Decipher the Role of Microglia in AD

To overcome species issues, microglial cell lines of human origin can be useful. They allow to study specific biological functions or functional pathways; however, they cannot reproduce the complexities of cells. This particularly true for cells which, like microglia, are highly adapted to their environment. Bone marrow-derived or blood monocytes-derived macrophages represent another source of human microglia-like cells. However, because these cells are of fundamentally different embryonic origin (Hoeffel and Ginhoux, 2015), they are likely poor models of adult microglia. Adult primary microglia can be harvested from dissociated brain area, but this process generally lead to low yields and can only sparsely be obtained for human samples. Moreover, isolation processes and culturing methods impact on gene expression pattern thus calling for caution in interpreting results based on these approaches (Gosselin et al., 2017).

An alternative to those issues is the development of cell reprograming methods, which offer the possibility to generate human pluripotent cell lines (hiPSCs) from healthy individuals but also from patients with specific diseases (Sullivan and Young-Pearse, 2017). Human iPSCs-derived neural cells can be produced in consistent yields. In the context of AD, iPSC-derived neurons issued from either familial AD (FAD) patients carrying mutations found in AD or sporadic AD (SAD) patients recapitulate some of the main hallmarks of the disease (Poon et al., 2017). Similarly, astrocytes derived from AD-patient iPSC show significant morphological and functional alterations, including up-regulation of inflammatory cytokines (Chandrasekaran et al., 2016; Auboyer et al., 2019).

Human pluripotent cell lines have recently been successfully differentiated into microglia (Muffat et al., 2016; Abud et al., 2017; Douvaras et al., 2017; Haenseler et al., 2017; Takata et al., 2017; Pocock and Piers, 2018). Although there is yet no consensus protocol to obtain hiPSCs-derived microglia, all protocols follow similar steps based on this cell type ontogeny. Based on such protocol, Garcia-Reitboeck et al. (2018) recently described microglial dysfunctions in hiPSCs-derived microglia from TREM2 T66M and W50C carriers, thus outlining the interest of such iPSCs approaches to decipher the role of microglia functions and dysfunctions in AD. Deciphering to which extend hiPSCs microglia derived from different patients (i.e., different SADs and/or different FAD mutations) share the same molecular and/or functional characteristics will help better understand the heterogeneity of AD, and may open the way toward the use of hiPSCs to implement personalized treatment in AD.

An important emerging concept is that, because microglia are CNS resident macrophages highly adapted to the CNS environment, a two-steps protocol is required to obtain

hiPSCs-derived microglia with genuine microglial functions. In this scheme, the first step is to obtain iPSCs-derived macrophages progenitors and second to grow them in a conditioned environment, i.e., in the presence of other neural cells (Lee C.Z.W. et al., 2018). Under such experimental settings, hiPSCs-derived microglia exhibit phenotype, gene expression profile and functional properties close to brain-isolated microglia (Pandya et al., 2017; Takata et al., 2017).

Maintenance of tissue architecture is an important aspect of *in vivo* studies. Interestingly, hiPSCs derived cells can be grown in 3D cultures to model the cytoarchitecture and the connectivity of the brain while allowing *in vitro* manipulation and experimentation. Such 3D or organoids models open the way for studying human microglia under conditions that are close to physiological and physio-pathological context. Although specific pitfalls exist with such approaches, including the need to develop isogenic controls to alleviate the risk of cofounding factors due to difference in genetic backgrounds between patients and controls, there is little doubt that these approaches will be instrumental to decipher the role of microglia in the progression of AD.

CONCLUDING REMARKS

Glial cells, including microglia, have long been suspected to play a role in Alzheimer's disease but only because of their ability to react to neuronal dysfunctions (e.g., Amyloid and Tau aggregates). This neurocentric view, which considered glial cells as secondary, has been challenged recently by the results of genetic association studies identifying genetic loci associated with risk of Alzheimer's that are associated to genes preferentially or exclusively expressed in glial cells (Verheijen and Sleegers, 2018). This has refined our view of how Alzheimer disease initiates and progresses, and introduced new concepts and ideas for Alzheimer's pathophysiological mechanisms, both at the molecular and cellular levels.

Because of their abilities to sense and react to their environment, reactive microglia are likely playing key early roles in the disease progression and may lead to the identification of early biomarkers. Because they can drive functional changes in astrocytes (Liddelow and Barres, 2017) and crosstalk with non-neuronal immune cells (Dionisio-Santos et al., 2019), they also represent attractive drug targets to stop or limit the disease progression.

As reported here, the exact contribution of the different reactive microglia subtypes to AD is currently unclear and the subject of intense researches. Over the recent years, several technological breakthroughs have been achieved, allowing scientists to address new challenging questions. These technical developments now allow studying microglia roles with medium or high throughput flows, and perform fine analysis of their functions in preserved environments. A better understanding of the contribution of microglia cells to AD initiation and progression is expected to renew the interest of big pharma to re-invest in the field and will pave the way toward better designed strategies.

Many factors need to be considered, including sex, age, species, molecular diversity, health status, communication with the periphery, etc., to fully decipher the role of microglia in AD. These are undoubtedly challenging but also very exciting fields of research, which hold the promise of defining innovative therapeutic strategies and reduce the socio-economic burden of this devastating disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A-LH, JH, LU, and HH designed and drafted the sections of the manuscript. A-LH prepared the tables and the figures.

FUNDING

This study was supported by the France Alzheimer, Fondation Alzheimer, LABEX ICST and the Fondation NRJ.

REFERENCES

Abbracchio, M. P., and Ceruti, S. (2007). P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal.* 3, 13–25. doi: 10.1007/s11302-006-9033-z

Abdel Rassoul, R., Alves, S., Pantesco, V., De Vos, J., Michel, B., Perret, M., et al. (2010). Distinct transcriptome expression of the temporal cortex of the primate *Microcebus murinus* during brain aging versus Alzheimer's disease-like pathology. *PLoS One* 5:e12770. doi: 10.1371/journal.pone.0012770

Abud, E. M., Ramirez, R. N., Martinez, E. S., Healy, L. M., Nguyen, C. H. H., Newman, S. A., et al. (2017). iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron* 94, 278–293.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.042

Adinolfi, E., Giuliani, A. L., De Marchi, E., Pegoraro, A., Orioli, E., and Di Virgilio, F. (2018). The P2X7 receptor: a main player in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 151, 234–244. doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.021

Agosta, F., Dalla Libera, D., Spinelli, E. G., Finardi, A., Canu, E., Bergami, A., et al. (2014). Myeloid microvesicles in cerebrospinal fluid are associated with myelin damage and neuronal loss in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 76, 813–825. doi: 10.1002/ana.24235

Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F. M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10, 1538–1543. doi: 10.1038/nn2014

Ajit, D., Woods, L. T., Camden, J. M., Thebeau, C. N., El-Sayed, F. G., Greeson, G. W., et al. (2014). Loss of P2Y2 nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 49, 1031–1042. doi: 10.1007/s12035-013-8577-5

Alzheimer, A. (1907). über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. und phychish-Gerichtliche Medizin* 64, 146–148.

Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593. doi: 10.1038/nn.4132

Auboyer, L., Monzo, C., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Gabelle, A., Gazagne, I., et al. (2019). Generation of induced pluripotent stem cells (IRMBi001-A) from an Alzheimer's disease patient carrying a G217D mutation in the PSEN1 gene. *Stem Cell Res.* 34:1013183. doi: 10.1016/j.scr.2018.101381

Basilico, B., Pagani, F., Grimaldi, A., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Weinhard, L., et al. (2019). Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses. *Glia* 67, 53–67. doi: 10.1002/glia.23508

Bedner, P., Dupper, A., Huttmann, K., Muller, J., Herde, M. K., Dublin, P., et al. (2015). Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138, 1208–1222. doi: 10.1093/brain/awv067

Belinson, H., and Michaelson, D. M. (2009). ApoE4-dependent Aβ-mediated neurodegeneration is associated with inflammatory activation in the hippocampus but not the septum. *J. Neural Transm.* 116, 1427–1434. doi: 10.1007/s00702-009-0218-9

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., and Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9:278. doi: 10.3389/fncel.2015.00278

Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M. F., et al. (2008). Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 623–632. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.10.008

Bhattacharya, A., and Biber, K. (2016). The microglial ATP-gated ion channel P2X7 as a CNS drug target. *Glia* 64, 1772–1787. doi: 10.1002/glia.23001

Bishop, N. A., Lu, T., and Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–535. doi: 10.1038/nature08983

Bons, N., Rieger, F., Prudhomme, D., Fisher, A., and Krause, K.-H. (2006). *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav.* 5, 120–130. doi: 10.1111/j.1601-183X.2005.00149.x

Bouchon, A., Hernández-Munain, C., Cella, M., and Colonna, M. (2002). A Dap12-mediated pathway regulates expression of Cc chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194, 1111–1122. doi: 10.1084/jem.194.8.1111

Brawek, B., Schwendele, B., Riester, K., Kohsaka, S., Lerdkrai, C., Liang, Y., et al. (2014). Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. *Acta Neuropathol.* 127, 495–505. doi: 10.1007/s00401-013-1242-2

Bruce-Keller, A. J., Gupta, S., Parrino, T. E., Knight, A. G., Ebenezer, P. J., Weidner, A. M., et al. (2010). NOX activity is increased in mild cognitive impairment. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1371–1382. doi: 10.1089/ars.2009.2823

Burguillos, M. A., Deierborg, T., Kavanagh, E., Persson, A., Hajji, N., Garcia-Quintanilla, A., et al. (2011). Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472, 319–324. doi: 10.1038/nature09788

Burnstock, G. (2016). An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology* 104, 4–17. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.031

Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., et al. (2014). Identification of a unique TGF-β–dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* 17, 131–143. doi: 10.1038/nn.3599

Calovi, S., Mut-Arbona, P., and Sperlágh, B. (2019). Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience* 405, 137–147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.021

Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–924. doi: 10.1038/nn1715

Carroll, J. C., Rosario, E. R., Kreimer, S., Villamagna, A., Gentzschein, E., Stanczyk, F. Z., et al. (2010). Sex differences in β-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res.* 1366, 233–245. doi: 10.1016/j.brainres.2010.10.009

Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* 3:89ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.3002156

Chandrasekaran, A., Avci, H. X., Leist, M., Kobolak, J., and Dinnyes, A. (2016). Astrocyte differentiation of human pluripotent stem cells: new tools for neurological disorder research. *Front. Cell. Neurosci.* 10:215. doi: 10.3389/fncel.2016.00215

Charriaut-Marlangue, C., Leconte, C., Csaba, Z., Chafa, L., Pansiot, J., Talatizi, M., et al. (2018). Sex differences in the effects of PARP inhibition on microglial phenotypes following neonatal stroke. *Brain. Behav. Immun.* 73, 375–389. doi: 10.1016/j.bbi.2018.05.022

Cho, S. H., Sun, B., Zhou, Y., Kauppinen, T. M., Halabisky, B., Wes, P., et al. (2011). CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286, 32713–32722. doi: 10.1074/jbc.M111.254268

Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., et al. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol. Dis.* 28, 76–82. doi: 10.1016/j.nbd.2007.06.013

Combs, C. K., Johnson, D. E., Cannady, S. B., Lehman, T. M., and Landreth, G. E. (1999). Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of β-amyloid and prion proteins. *J. Neurosci.* 19, 928–939. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-03-00928.1999

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.

Czirr, E., Castello, N. A., Mosher, K. I., Castellano, J. M., Hinkson, I. V., Lucin, K. M., et al. (2017). Microglial complement receptor 3 regulates brain Aβ levels through secreted proteolytic activity. *J. Exp. Med.* 214, 1081–1092. doi: 10.1084/jem.20162011

Daborg, J., Andreasson, U., Pekna, M., Lautner, R., Hanse, E., Minthon, L., et al. (2012). Cerebrospinal fluid levels of complement proteins C3, C4 and CR1 in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 119, 789–797. doi: 10.1007/s00702-012-0797-8

D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., et al. (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 69–79. doi: 10.1038/nn.2709

Davis, M. M. (2012). Immunology taught by humans. *Sci. Transl. Med.* 4:117fs2. doi: 10.1126/scitranslmed.3003385

DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Parsadanian, M., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, J. W., et al. (2004). ApoE and clusterin cooperatively suppress Aβ levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Aβ metabolism *in vivo*. *Neuron* 41, 193–202. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00850-X

Dionisio-Santos, D. A., Olschowka, J. A., and O'Banion, M. K. (2019). Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 16:74. doi: 10.1186/s12974-019-1453-0

Douvaras, P., Sun, B., Wang, M., Kruglikov, I., Lallos, G., Zimmer, M., et al. (2017). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to microglia. *Stem Cell Rep.* 8, 1516–1524. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.023

Dubbelaar, M. L., Kracht, L., Eggen, B. J. L., and Boddeke, E. W. G. M. (2018). The Kaleidoscope of microglial phenotypes. *Front. Immunol.* 9:1753. doi: 10.3389/fimmu.2018.01753

Dumont, M., and Beal, M. F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1014–1026. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026

Egensperger, R., Kösel, S., Eitzen, U., and Graeber, M. B. (1998). Microglial activation in Alzheimer disease: association with APOE genotype. *Brain Pathol.* 8, 439–447. doi: 10.1111/j.1750-3639.1998.tb00166.x

Erb, L., Woods, L. T., Khalafalla, M. G., and Weisman, G. A. (2018). Purinergic signaling in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.014 [Epub ahead of print].

Fagan, A. M., Watson, M., Parsadanian, M., Bales, K. R., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2002). Human and murine ApoE markedly alters Aβ metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 9, 305–318. doi: 10.1006/nbdi.2002.0483

Fan, Z., Brooks, D. J., Okello, A., and Edison, P. (2017). An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain* 140, 792–803. doi: 10.1093/brain/aww349

Färber, K., and Kettenmann, H. (2006). Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* 54, 656–665. doi: 10.1002/glia.20412

Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santuccione Chadha, A., et al. (2018). Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 457–469. doi: 10.1038/s41582-018-0032-9

Fonseca, M. I., Zhou, J., Botto, M., and Tenner, A. J. (2004). Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 6457–6465. doi: 10.1523/jneurosci.0901-04.2004

Frank, S., Burbach, G. J., Bonin, M., Walter, M., Streit, W., Bechmann, I., et al. (2008). TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice. *Glia* 56, 1438–1447. doi: 10.1002/glia.20710

Friedman, B. A., Srinivasan, K., Ayalon, G., Meilandt, W. J., Lin, H., Huntley, M. A., et al. (2018). Diverse brain myeloid expression profiles reveal distinct microglial activation states and aspects of Alzheimer's disease not evident in mouse models. *Cell Rep.* 22, 832–847. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066

Fu, H., Liu, B., Frost, J. L., Hong, S., Jin, M., Ostaszewski, B., et al. (2012). Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to

the phagocytosis and clearance of fibrillar Aβ by microglia. *Glia* 60, 993–1003. doi: 10.1002/glia.22331

Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K. E., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., et al. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 13, 411–413. doi: 10.1038/nn.2511

Galatro, T. F., Holtman, I. R., Lerario, A. M., Vainchtein, I. D., Brouwer, N., Sola, P. R., et al. (2017). Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci.* 20, 1162–1171. doi: 10.1038/nn.4597

Gallagher, J. J., Minogue, A. M., and Lynch, M. A. (2013). Impaired performance of female APP/PS1 mice in the morris water maze is coupled with increased Aβ accumulation and microglial activation. *Neurodegener. Dis.* 11, 33–41. doi: 10.1159/000337458

Garcia-Reitboeck, P., Phillips, A., Piers, T. M., Villegas-Llerena, C., Butler, M., Mallach, A., et al. (2018). Human induced pluripotent stem cell-derived microglia-like cells harboring TREM2 missense mutations show specific deficits in phagocytosis. *Cell Rep.* 24, 2300–2311. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.094

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845. doi: 10.1126/science.1194637

Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetzki, J. C. M., Sajti, E., et al. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science* 356:eaal3222. doi: 10.1126/science.aal3222

Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., et al. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 19, 504–516. doi: 10.1038/nn.4222

Graeber, M. B., Kösel, S., Egensperger, R., Banati, R. B., Müller, U., Bise, K., et al. (1997). Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* 1, 73–80. doi: 10.1007/s100480050011

Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., et al. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 86, 7611–7615. doi: 10.1073/pnas.86.19.7611

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., et al. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127. doi: 10.1056/NEJMoa1211851

Guneykaya, D., Ivanov, A., Hernandez, D. P., Haage, V., Wojtas, B., Meyer, N., et al. (2018). Transcriptional and translational differences of microglia from male and female brains. *Cell Rep.* 24, 2773–2783.e6. doi: 10.1016/J.CELREP.2018.08.001

Guo, L., Ladu, M. J., and Van Eldik, L. J. (2004). A dual role for apolipoprotein E in neuroinflammation anti-and pro-inflammatory activity. *J. Mol. Neurosci.* 23, 205–212.

Haenseler, W., Sansom, S. N., Buchrieser, J., Newey, S. E., Moore, C. S., Nicholls, F. J., et al. (2017). A highly efficient human pluripotent stem cell microglia model displays a neuronal-co-culture-specific expression profile and inflammatory response. *Stem Cell Rep.* 8, 1727–1742. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.017

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., et al. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-β. *Nat. Immunol.* 9, 857–865. doi: 10.1038/ni.1636

Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., et al. (2019). Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes. *Immunity* 50, 253–271.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.004

Hanisch, U. K., and Ketternmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997

Hansen, D. V., Hanson, J. E., and Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 217, 459–472. doi: 10.1083/jcb.201709069

Harrigan, T. J., Abdullaev, I. F., Jourd'heuil, D., and Mongin, A. A. (2008). Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. *J. Neurochem.* 106, 2449–2462. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05553.x

Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M., and Rossor, M. N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 1206–1209. doi: 10.1136/JNNP.74.9.1206

Hashimoto, T., Serrano-Pozo, A., Hori, Y., Adams, K. W., Takeda, S., Banerji, A. O., et al. (2012). Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid peptide. *J. Neurosci.* 32, 15181–15192. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012

Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W.-B., et al. (2006). The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519. doi: 10.1038/nn1805

Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A., and Evans, D. A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778–1783. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828726f5

Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678. doi: 10.1038/nature11729

Heuer, E., Rosen, R. F., Cintron, A., and Walker, L. C. (2012). Nonhuman primate models of Alzheimer-like cerebral proteopathy. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1159–1169.

Hirbec, H. E., Noristani, H. N., and Perrin, F. E. (2017). Microglia responses in acute and chronic neurological diseases: what microglia-specific transcriptomic studies taught (and did Not Teach) Us. *Front. Aging Neurosci.* 9:227. doi: 10.3389/fnagi.2017.00227

Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Front. Immunol.* 6:486. doi: 10.3389/fimmu.2015.00486

Hoffmann, A., Kann, O., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2003). Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J. Neurosci.* 23, 4410–4419. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-11-04410.2003

Holtman, I. R., Raj, D. D., Miller, J. A., Schaafsma, W., Yin, Z., Brouwer, N., et al. (2015). Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol. Commun.* 3:31. doi: 10.1186/s40478-015-0203-5

Holtman, I. R., Skola, D., and Glass, C. K. (2017). Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J. Clin. Invest.* 127, 3220–3229. doi: 10.1172/JCI90604

Holtzman, D. M., Bales, K. R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A. M., et al. (1999). Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 103, R15–R21. doi: 10.1172/JCI6179

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716. doi: 10.1126/science.aad8373

Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2012). Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J. Neurosci.* 32, 15106–15111. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012

Hudry, E., Dashkoff, J., Roe, A. D., Takeda, S., Koffie, R. M., Hashimoto, T., et al. (2013). Gene transfer of human Apoe isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain. *Sci. Transl. Med.* 5:212ra161. doi: 10.1126/scitranslmed.3007000

Janus, C., Flores, A. Y., Xu, G., and Borchelt, D. R. (2015). Behavioral abnormalities in APP_{Swe}/PS1dE9 mouse model of AD-like pathology: comparative analysis across multiple behavioral domains. *Neurobiol. Aging* 36, 2519–2532. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.010

Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., et al. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.* 212, 287–295. doi: 10.1084/jem.20142322

Jiang, T., Tan, L., Zhu, X.-C., Zhang, Q.-Q., Cao, L., Tan, M.-S., et al. (2014). Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 39, 2949–2962. doi: 10.1038/npp.2014.164

Jiao, S.-S., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Zhu, C., Wang, Q.-H., Shen, L.-L., et al. (2016). Sex dimorphism profile of Alzheimer's disease-type pathologies in an APP/PS1 mouse model. *Neurotox. Res.* 29, 256–266. doi: 10.1007/s12640-015-9589-x

Jin, S. C., Benitez, B. A., Karch, C. M., Cooper, B., Skorupa, T., Carrell, D., et al. (2014). Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5838–5846. doi: 10.1093/hmg/ddu277

Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107–116. doi: 10.1056/NEJMoa1211103

Joshi, P., Turola, E., Ruiz, A., Bergami, A., Libera, D. D., Benussi, L., et al. (2014). Microglia convert aggregated amyloid-β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ.* 21, 582–593. doi: 10.1038/cdd.2013.180

Jullienne, A., Salehi, A., Affeldt, B., Baghchechi, M., Haddad, E., Avitua, A., et al. (2018). Male and female mice exhibit divergent responses of the cortical vasculature to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 35, 1646–1658. doi: 10.1089/neu.2017.5547

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., et al. (2017). A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 169, 1276–1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018

Kierdorf, K., and Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. *J. Clin. Invest.* 127, 3201–3209. doi: 10.1172/JCI90602

Kiialainen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O., and Peltonen, L. (2005). Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol. Dis.* 18, 314–322. doi: 10.1016/j.nbd.2004.09.007

Kim, H. J., Ajit, D., Peterson, T. S., Wang, Y., Camden, J. M., Gibson Wood, W., et al. (2012). Nucleotides released from Aβ1-42-treated microglial cells increase cell migration and Aβ1-42 uptake through P2Y2 receptor activation. *J. Neurochem.* 121, 228–238. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x

Kim, T. S., Lim, H. K., Lee, J. Y., Kim, D. J., Park, S., Lee, C., et al. (2008). Changes in the levels of plasma soluble fractalkine in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 436, 196–200. doi: 10.1016/j.neulet.2008.03.019

Koffie, R. M., Hashimoto, T., Tai, H.-C., Kay, K. R., Serrano-Pozo, A., Joyner, D., et al. (2012). Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-β. *Brain* 135, 2155–2168. doi: 10.1093/brain/aws127

Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J. L., Eom, G. D., Bernhardt, U., et al. (2013). Functional impairment of microglia coincides with beta-amyloid deposition in mice with alzheimer-like pathology. *PLoS One* 8:e60921. doi: 10.1371/journal.pone.0060921

Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., et al. (2017). The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity* 47, 566–581.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008

Labzin, L. I., Heneka, M. T., and Latz, E. (2017). Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Med.* 69, 437–449. doi: 10.1146/annurev-med-050715-104343

Lai, M. K. P., Tan, M. G. K., Kirvell, S., Hobbs, C., Lee, J., Esiri, M. M., et al. (2008). Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *J. Neural Transm.* 115, 1165–1172. doi: 10.1007/s00702-008-0067-y

Lajaunias, F., Dayer, J. M., and Chizzolini, C. (2005). Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur. J. Immunol.* 35, 243–251. doi: 10.1002/eji.200425273

Le Corre, M., Noristani, H. N., Mestre-Frances, N., Saint-Martin, G. P., Coillot, C., Goze-Bac, C., et al. (2018). A Novel Translational Model of Spinal Cord Injury in Nonhuman Primate. *Neurotherapeutics* 15, 751–769. doi: 10.1007/s13311-017-0589-9

Lee, C. Y. D., Daggett, A., Gu, X., Jiang, L.-L., Langfelder, P., Li, X., et al. (2018). Elevated TREM2 gene dosage reprograms microglia responsivity and ameliorates pathological phenotypes in Alzheimer's disease models. *Neuron* 97, 1032–1048.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.002

Lee, C. Z. W., Kozaki, T., and Ginhoux, F. (2018). Studying tissue macrophages in vitro: are iPSC-derived cells the answer? *Nat. Rev. Immunol.* 18, 716–725. doi: 10.1038/s41577-018-0054-y

Lee, J. H., Yu, W. H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., et al. (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141, 1146–1158. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.008

Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C.-A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., and Zheng, H. (2016). Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 36, 577–589. doi: 10.1523/jneurosci.2117-15.2016

Liddelow, S. A., and Barres, B. A. (2017). Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 46, 957–967. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006

Loerch, P. M., Lu, T., Dakin, K. A., Vann, J. M., Isaacs, A., Geula, C., et al. (2008). Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One* 3:e3329. doi: 10.1371/journal.pone.0003329

Lynch, J. R., Morgan, D., Mance, J., Matthew, W. D., and Laskowitz, D. T. (2001). Apolipoprotein E modulates glial activation and the endogenous central nervous system inflammatory response. *J. Neuroimmunol.* 114, 107–113. doi: 10.1016/S0165-5728(00)00459-8

Lyons, A., Lynch, A. M., Downer, E. J., Hanley, R., O'Sullivan, J. B., Smith, A., et al. (2009). Fractalkine-induced activation of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway attentuates microglial activation *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* 110, 1547–1556. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06253.x

Macosko, E. Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., et al. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 161, 1202–1214. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.002

Maier, M., Peng, Y., Jiang, L., Seabrook, T. J., Carroll, M. C., and Lemere, C. A. (2008). Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* 28, 6333–6341. doi: 10.1523/jneurosci.0829-08.2008

Mapplebeck, J. C. S., Dalgarno, R., Tu, Y., Moriarty, O., Beggs, S., Kwok, C. H. T., et al. (2018). Microglial P2X4R-evoked pain hypersensitivity is sexually dimorphic in rats. *Pain* 159, 1752–1763. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001265

Martin, E., Amar, M., Dalle, C., Youssef, I., Boucher, C., Le Duigou, C., et al. (2018). New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Psychiatry* 24, 108–125. doi: 10.1038/s41380-018-0108-3

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. *Mol. Cell* 10, 417–426. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3

Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Bottcher, C., Amann, L., Scheiwe, C., et al. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392. doi: 10.1038/s41586-019-0924-x

McLarnon, J. G. (2005). Purinergic mediated changes in Ca2+ mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP. *J. Neurosci. Res.* 81, 349–356. doi: 10.1002/jnr.20475

McLarnon, J. G., Choi, H. B., Lue, L.-F., Walker, D. G., and Kim, S. U. (2005). Perturbations in calcium-mediated signal transduction in microglia from Alzheimer's disease patients. *J. Neurosci. Res.* 81, 426–435. doi: 10.1002/jnr.20487

McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G., and Choi, H. B. (2006). Upregulated expression of purinergic P2X 7 receptor in Alzheimer disease and amyloid-β peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 1090–1097. doi: 10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3

McQuade, A., and Blurton-Jones, M. (2019). Microglia in Alzheimer's disease: exploring how genetics and phenotype influence risk. *J. Mol. Biol.* 431, 1805–1817. doi: 10.1016/J.JMB.2019.01.045

Melief, J., Koning, N., Schuurman, K. G., Van De Garde, M. D. B., Smolders, J., Hoek, R. M., et al. (2012). Phenotyping primary human microglia: tight regulation of LPS responsiveness. *Glia* 60, 1506–1517. doi: 10.1002/glia.22370

Mestre-Francés, N., Keller, E., Calenda, A., Barelli, H., Checler, F., and Bons, N. (2000). Immunohistochemical analysis of cerebral cortical and vascular lesions in the primate *Microcebus murinus* reveal distinct amyloid beta1-42 and beta1-40 immunoreactivity profiles. *Neurobiol. Dis.* 7, 1–8. doi: 10.1006/nbdi.1999.0270

Mildner, A., Huang, H., Radke, J., Stenzel, W., and Priller, J. (2017). P2Y 12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 65, 375–387. doi: 10.1002/glia.23097

Minett, T., Classey, J., Matthews, F. E., Fahrenhold, M., Taga, M., Brayne, C., et al. (2016). Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J. Neuroinflammation* 13:135. doi: 10.1186/s12974-016-0601-z

Muffat, J., Li, Y., Yuan, B., Mitalipova, M., Omer, A., Corcoran, S., et al. (2016). Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* 22, 1358–1367. doi: 10.1038/nm.4189

Naslund, J., Thyberg, J., Wernstedt, C., Ft Karlstrom, A., Bogdanovic, N., Samuel Gandy, I. E., et al. (1995). Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid B peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* 15, 219–228.

Nelson, L. H., Warden, S., and Lenz, K. M. (2017). Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus. *Brain. Behav. Immun.* 64, 11–22. doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.010

Ni, J., Wang, P., Zhang, J., Chen, W., and Gu, L. (2013). Silencing of the P2X7 receptor enhances amyloid-β phagocytosis by microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 363–369. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.079

Nissen, J. C. (2017). Microglial function across the spectrum of age and gender. *Int. J. Mol. Sci.* 18:E561. doi: 10.3390/ijms18030561

Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., et al. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 113–122. doi: 10.1093/jnen/64.2.113

Nizami, S., Hall-Roberts, H., Warrier, S., Cowley, S. A., and Di Daniel, E. (2019). Microglial inflammation and phagocytosis in Alzheimer's disease: potential therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* doi: 10.1111/bph.14618 [Epub ahead of print].

Nnah, I. C., and Wessling-Resnick, M. (2018). Brain iron homeostasis: a focus on microglial iron. *Pharmaceuticals* 11:E129. doi: 10.3390/ph11040129

Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H., Kooijman, L., Bossers, K., et al. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol. Aging* 35, 2746–2760. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004

Pandya, H., Shen, M. J., Ichikawa, D. M., Sedlock, A. B., Choi, Y., Johnson, K. R., et al. (2017). Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat. Neurosci.* 20, 753–759. doi: 10.1038/nn.4534

Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458. doi: 10.1126/science.1202529

Parhizkar, S., Arzberger, T., Brendel, M., Kleinberger, G., Deussing, M., Focke, C., et al. (2019). Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nat. Neurosci.* 22, 191–204. doi: 10.1038/s41593-018-0296-9

Perkins, A. E., Piazza, M. K., and Deak, T. (2018). Stereological analysis of microglia in aged male and female fischer 344 rats in socially relevant brain regions. *Neuroscience* 377, 40–52. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.028

Piccio, L., Buonsanti, C., Mariani, M., Cella, M., Gilfillan, S., Cross, A. H., et al. (2007). Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 37, 1290–1301. doi: 10.1002/eji.200636837

Pocock, J. M., and Piers, T. M. (2018). Modelling microglial function with induced pluripotent stem cells: an update. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 445–452. doi: 10.1038/s41583-018-0030-3

Poon, A., Zhang, Y., Chandrasekaran, A., Phanthong, P., Schmid, B., Nielsen, T. T., et al. (2017). Modeling neurodegenerative diseases with patient-derived induced pluripotent cells: possibilities and challenges. *N. Biotechnol.* 39, 190–198. doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.009

Próchnicki, T., Mangan, M. S., and Latz, E. (2016). Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Research* 5:1469. doi: 10.12688/f1000research.8614.1

Ransohoff, R. M. (2018). All (animal) models (of neurodegeneration) are wrong. Are they also useful? *J. Exp. Med.* 215, 2955–2958. doi: 10.1084/jem.20182042

Ransohoff, R. M., and Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528

Rodriguez, G. A., Tai, L. M., LaDu, M. J., and Rebeck, G. W. (2014). Human APOE4 increases microglia reactivity at Aβ plaques in a mouse model of Aβ deposition. *J. Neuroinflammation* 11:111. doi: 10.1186/1742-2094-11-111

Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., et al. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 17, 661–663. doi: 10.1038/nn.3697

Sakakibara, Y., Sekiya, M., Saito, T., Saido, T. C., and Iijima, K. M. (2018). Cognitive and emotional alterations in App knock-in mouse models of Aβ amyloidosis. *BMC Neurosci.* 19:46. doi: 10.1186/s12868-018-0446-8

Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Fattorelli, N., Thrupp, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., et al. (2019). The major risk factors for Alzheimer's disease: age, sex, and genes modulate the microglia response to Aβ plaques. *Cell Rep.* 27, 1293–1306.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.099

Salamanca, L., Mechawar, N., Murai, K. K., Balling, R., Bouvier, D. S., and Skupin, A. (2019). MIC-MAC: An automated pipeline for high-throughput characterization and classification of three-dimensional microglia morphologies in mouse and human postmortem brain samples. *Glia* 67, 1496–1509. doi: 10.1002/glia.23623

Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., et al. (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 287, 3842–3849. doi: 10.1074/jbc.M111.277061

Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M., Sanchez-Varo, R., Nuñez-Diaz, C., et al. (2016). Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.* 132, 897–916. doi: 10.1007/s00401-016-1630-5

Sanz, J. M., Falzoni, S., Rizzo, R., Cipollone, F., Zuliani, G., and Di Virgilio, F. (2014). Possible protective role of the 489C>T P2X7R polymorphism in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 60, 117–119. doi: 10.1016/j.exger.2014.10.009

Sarasa, M., and Pesini, P. (2009). Natural non-trasgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 171–178. doi: 10.2174/156720509787602834

Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., et al. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 36, 2473–2487. doi: 10.15252/embj.201797397

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026

Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., et al. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9649–9653.

Schmid, C. D., Sautkulis, L. N., Danielson, P. E., Cooper, J., Hasel, K. W., Hilbush, B. S., et al. (2002). Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* 83, 1309–1320. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01243.x

Schmidt, F., Boltze, J., Jäger, C., Hofmann, S., Willems, N., Seeger, J., et al. (2015). Detection and quantification of β-amyloid, pyroglutamyl Aβ, and tau in aged canines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 912–923. doi: 10.1097/NEN.0000000000000230

Schwarz, J. M., Sholar, P. W., and Bilbo, S. D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J. Neurochem.* 120, 948–963. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x

Seok, J., Cuenca, H. S. W. A. G., Mindrinos, M. N., Bakerc, H. V., Xua, W., Richardsd, D. R., et al. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3507–3512. doi: 10.1073/pnas.1222878110

Serrano-Pozo, A., Qian, J., Monsell, S. E., Betensky, R. A., Hyman, B. T., and Massachusetts Alzheimer, P. (2015). APOEε2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 77, 917–929. doi: 10.1002/ana.24369

Sieber, M. W., Jaenisch, N., Brehm, M., Guenther, M., Linnartz-Gerlach, B., Neumann, H., et al. (2013). Attenuated inflammatory response in triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) knock-out mice following stroke. *PLoS One* 8:e52982. doi: 10.1371/journal.pone.0052982

Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., and Kettenmann, H. (2016). The "Big-Bang" for modern glial biology:

translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64, 1801–1840. doi: 10.1002/glia.23046

Smith, A. M., and Dragunow, M. (2014). The human side of microglia. *Trends Neurosci.* 37, 125–135. doi: 10.1016/j.tins.2013.12.001

Smith, A. M., Gibbons, H. M., Oldfield, R. L., Bergin, P. M., Mee, E. W., Curtis, M. A., et al. (2013). M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J. Neuroinflammation* 10:85. doi: 10.1186/1742-2094-10-85

Sorge, R. E., Mapplebeck, J. C. S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J. K., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* 18, 1081–1085. doi: 10.1038/nn.4053

Sousa, C., Biber, K., and Michelucci, A. (2017). Cellular and molecular characterization of microglia: a unique immune cell population. *Front. Immunol.* 8:198. doi: 10.3389/fimmu.2017.00198

Stephan, A. H., Barres, B. A., and Stevens, B. (2012). The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 369–389. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113810

Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L.-M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., et al. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid, B peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8098–8102.

Sullivan, S. E., and Young-Pearse, T. L. (2017). Induced pluripotent stem cells as a discovery tool for Alzheimer×s disease. *Brain Res.* 1656, 98–106. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.005

Suurväli, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J., and Rüütel Boudinot, S. (2017). P2X4: a fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed. J.* 40, 245–256. doi: 10.1016/j.bj.2017.06.010

Takahashi, K., Rochford, C. D. P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201, 647–657. doi: 10.1084/jem.20041611

Takata, K., Kozaki, T., Lee, C. Z. W., Thion, M. S., Otsuka, M., Lim, S., et al. (2017). Induced-pluripotent-stem-cell-derived primitive macrophages provide a platform for modeling tissue-resident macrophage differentiation and function. *Immunity* 47, 183–198.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.017

Thangavel, R., Bhagavan, S. M., Ramaswamy, S. B., Surpur, S., Govindarajan, R., Kempuraj, D., et al. (2017). Co-expression of glia maturation factor and apolipoprotein E4 in Alzheimer's disease brain. *J. Alzheimer's Dis.* 61, 553–560. doi: 10.3233/JAD-170777

Thion, M. S., Low, D., Silvin, A., Chen, J., Grisel, P., Schulte-Schrepping, J., et al. (2018). Microbiome influences prenatal and adult microglia in a sex-specific manner. *Cell* 172, 500–516.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.042

Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L. J., and Corey-Bloom, J. (2004). Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 62, 1977–1983. doi: 10.1212/01.WNL.0000128091.92139.0F

Tong, B. C.-K., Wu, A. J., Li, M., and Cheung, K.-H. (2018). Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1865, 1745–1760. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.018

Trotta, T., Panaro, M. A., Cianciulli, A., Mori, G., Di Benedetto, A., and Porro, C. (2018). Microglia-derived extracellular vesicles in Alzheimer's disease: a double-edged sword. *Biochem. Pharmacol.* 148, 184–192. doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.020

Trouche, S. G., Maurice, T., Rouland, S., Verdier, J.-M., and Mestre-Francés, N. (2010). The three-panel runway maze adapted to *Microcebus murinus* reveals age-related differences in memory and perseverance performances. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 100–106. doi: 10.1016/j.nlm.2010.04.006

Ulrich, J. D., Finn, M., Wang, Y., Shen, A., Mahan, T. E., Jiang, H., et al. (2014). Altered microglial response to Aβ plaques in APPPS1-21 mice heterozygous for TREM2. *Mol. Neurodegener* 9:20. doi: 10.1186/1750-1326-9-20

Varma, R., Chai, Y., Troncoso, J., Gu, J., Xing, H., Stojilkovic, S. S., et al. (2009). Amyloid-β induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med.* 11, 63–75. doi: 10.1007/s12017-009-8073-2

Veerhuis, R., Nielsen, H. M., and Tenner, A. J. (2011). Complement in the brain. *Mol. Immunol.* 48, 1592–1603. doi: 10.1016/j.molimm.2011.04.003

Verdonk, F., Roux, P., Flamant, P., Fiette, L., Bozza, F. A., Simard, S., et al. (2016). Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *J. Neuroinflammation* 13:153. doi: 10.1186/S12974-016-0614-7

Verheijen, J., and Sleegers, K. (2018). Understanding Alzheimer disease at the interface between genetics and transcriptomics. *Trends Genet.* 34, 434–447. doi: 10.1016/j.tig.2018.02.007

Verkhratsky, A., Zorec, R., Rodríguez, J. J., and Parpura, V. (2016). Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 26, 74–79. doi: 10.1016/j.coph.2015.09.011

Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., et al. (2018). Sex-specific features of microglia from adult mice. *Cell Rep.* 23, 3501–3511. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.048

Villegas-Llerena, C., Phillips, A., Reitboeck, P. G., Hardy, J., and Pocock, J. M. (2016). Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 74–81. doi: 10.1016/j.conb.2015.10.004

Viña, J., and Lloret, A. (2010). Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-β peptide. *J. Alzheimer's Dis.* 20, S527–S533. doi: 10.3233/JAD-2010-100501

Vitek, M. P., Brown, C. M., and Colton, C. A. (2009). APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol. Aging* 30, 1350–1360. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.014

Wagner, D.-C., Riegelsberger, U. M., Michalk, S., Härtig, W., Kranz, A., and Boltze, J. (2011). Cleaved caspase-3 expression after experimental stroke exhibits different phenotypes and is predominantly non-apoptotic. *Brain Res.* 1381, 237–242. doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.041

Wagner, D.-C., Scheibe, J., Glocke, I., Weise, G., Deten, A., Boltze, J., et al. (2013). Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol. Exp.* 73, 79–87.

Wang, J., Tanila, H., Puoliväli, J., Kadish, I., and van Groen, T. (2003). Gender differences in the amount and deposition of amyloidβ in APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 318–327. doi: 10.1016/J.NBD.2003.08.009

Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., and Robinette, M. L. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061–1071. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049

Weinhard, L., Neniskyte, U., Vadisiute, A., di Bartolomei, G., Aygün, N., Riviere, L., et al. (2018). Sexual dimorphism of microglia and synapses during mouse postnatal development. *Dev. Neurobiol.* 78, 618–626. doi: 10.1002/dneu.22568

Wendt, S., Maricos, M., Vana, N., Meyer, N., Guneykaya, D., Semtner, M., et al. (2017). Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 58, 41–53. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.027

Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., and Kettenmann, H. (2017). Microglia in physiology and disease. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 619–643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406

Wyss-Coray, T., Yan, F., Lin, A. H.-T., Lambris, J. D., Alexander, J. J., Quigg, R. J., et al. (2002). Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10837–10842. doi: 10.1073/pnas.162350199

Yang, J.-T., Wang, Z.-J., Cai, H.-Y., Yuan, L., Hu, M.-M., Wu, M.-N., et al. (2018). Sex differences in neuropathology and cognitive behavior in APP/PS1/tau triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 34, 736–746. doi: 10.1007/s12264-018-0268-9

Yanguas-Casás, N., Crespo-Castrillo, A., de Ceballos, M. L., Chowen, J. A., Azcoitia, I., Arevalo, M. A., et al. (2018). Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid. *Glia* 66, 522–537. doi: 10.1002/glia.23263

Zhang, W., Yan, Z., Gao, J., Sun, L., Huang, X., Liu, Z., et al. (2014). Role and mechanism of microglial activation in iron-induced selective and progressive dopaminergic neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 49, 1153–1165. doi: 10.1007/s12035-013-8586-4

Zhao, W., Dumanis, S. B., Tamboli, I. Y., Rodriguez, G. A., Jo LaDu, M., Moussa, C. E. H., et al. (2014). Human APOE genotype affects intraneuronal A 1-42 accumulation in a lentiviral gene transfer model. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1365–1375. doi: 10.1093/hmg/ddt525

Zhao, Y., Wu, X., An, Z., Huang, T. Y., Xu, H., Li, X., et al. (2018). TREM2 Is a receptor for β-amyloid that mediates microglial function. *Neuron* 97, 1023–1031.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.031

Zhong, L., Wang, Z., Wang, D., Wang, Z., Martens, Y. A., Wu, L., et al. (2018). Amyloid-beta modulates microglial responses by binding to the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). *Mol. Neurodegener.* 13:15. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.003

Zhou, C.-N., Chao, F.-L., Zhang, Y., Jiang, L., Zhang, L., Luo, Y.-M., et al. (2018). Sex differences in the white matter and myelinated fibers of APP/PS1 mice and the effects of running exercise on the sex differences of AD mice. *Front. Aging Neurosci.* 10:243. doi: 10.3389/fnagi.2018.00243

Zhu, Y., Nwabuisi-Heath, E., Dumanis, S. B., Tai, L. M., Yu, C., Rebeck, G. W., et al. (2012). APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice. *Glia* 60, 559–569. doi: 10.1002/glia.22289

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

Copyright © 2019 Hemonnot, Hua, Ulmann and Hirbec. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

B

Publication 2

Brain, Behavior, and Immunity 91 (2021) 404–417

Contents lists available at ScienceDirect

Brain Behavior and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Analysis of CX3CR1 haplodeficiency in male and female APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice along Alzheimer disease progression

Anne-Laure Hemonnot-Girard [a,b,1], Audrey J. Valverde [a,b,1], Jennifer Hua [a,b], Charlene Delaygue [a,b], Nathalie Linck [a,b], Tangui Maurice [c], François Rassendren [a,b], Helene Hirbec [a,b,*]

[a] IGF, Institut de Génomique Fonctionnelle, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France
[b] Labex ICST, Montpellier, France
[c] MNDN, University of Montpellier, EPHE, INSERM, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Alzheimer disease
Mouse model
Microglia
CX3CR1
Fractalkine receptor
Sex
Learning and memory
Glial reaction
Inflammation

ABSTRACT

Microglia, the resident immune cells of the brain, have recently emerged as key players in Alzheimer Disease (AD) pathogenesis, but their roles in AD remain largely elusive and require further investigation. Microglia functions are readily altered when isolated from their brain environment, and microglia reporter mice thus represent valuable tools to study the contribution of these cells to neurodegenerative diseases such as AD. The CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice is one of the most popular microglia reporter mice, and has been used in numerous studies to investigate in vivo microglial functions, including in the context of AD research. However, until now, the impact of CX3CR1 haplodeficiency on the typical features of Alzheimer Disease has not been studied in depth.

To fill this gap, we generated APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice and analyzed these mice for Alzheimer's like pathology and neuroinflammation hallmarks. More specifically, using robust multifactorial statistical and multivariate analyses, we investigated the impact of CX3CR1 deficiency in both males and females, at three typical stages of the pathology progression: at early stage when Amyloid-β (Aβ) deposition just starts, at intermediate stage during Aβ accumulation phase and at more advanced stages when Aβ plaque number stabilizes. We found that CX3CR1 haplodeficiency had little impact on the progression of the pathology in the APP^{swe}/PSEN1^{dE9} model and demonstrated that the APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ line is a relevant and useful model to study the role of microglia in Alzheimer Disease. In addition, although Aβ plaques density is higher in females compared to age-matched males, we show that their glial reaction, inflammation status and memory deficits are not different.

1. Introduction

Alzheimer Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder and the most common cause of dementia worldwide. It mainly affects the elderly, with a much higher prevalence among women (Niu et al., 2017). The disease is characterized by different hallmarks including amyloid plaques, neurofibrillary tangles, neuroinflammation and, at advanced stages, brain atrophy (Bedner et al., 2015). Higher production and/or lower degradation of Amyloid-β (Aβ) fragments is thought to result in amyloid plaque formation, which represents one of the earliest and key events in AD pathogenesis. Transgenic mice harboring mutated human genes involved in the amyloid cascade provide valuable tools to study the disease progression (Esquerda-Canals et al., 2017). Among these models, the APP^{swe}/PSEN1^{dE9} is one of the most popular as it recapitulates most of the important features of the disease (Jankowsky et al., 2004). It has been characterized at behavioral, histological and molecular levels in several studies (see https://www.alzforum.org/research-models/appswepsen1de9-c57bl6), however none of them have evaluated the effect of sex on disease progression using these multiple approaches.

Long considered as a consequence of the pathology, reactive glia and associated neuroinflammation are now regarded as playing key roles in AD initiation and progression. Indeed, human genetic studies identified over 25 genetic loci that robustly associate with AD risk (Hansen et al.,

* Corresponding author.
E-mail address: helene.hirbec@igf.cnrs.fr (H. Hirbec).
[1] These two authors contributed equally to the work.

https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.021
Received 6 July 2020; Received in revised form 2 October 2020; Accepted 21 October 2020
Available online 24 October 2020
0889-1591/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

2018; Verheijen and Sleegers, 2018). Among them, most genetic variants (Trem2, Ms4a genes, Picalm, etc.) code for proteins that are preferentially or exclusively expressed in microglia (Bellenguez et al., 2020). These findings strongly support a causal involvement of microglial cells in AD pathogenesis and generated a strong interest for studying these cells in AD (Cuello, 2017; Fan et al., 2017; Hampel et al., 2020; Nordengen et al., 2019). Yet, the roles of microglia in AD initiation and progression are unclear and heavily debated, with conflicting reports regarding their detrimental or protective contribution to the disease (for review see Takatori et al., 2019). Microglia are very sensitive cells that rapidly change morphology and function in-vitro, prompting the development of microglial reporter mice to study microglia in their natural environment (Gosselin et al., 2017).

CX3CR1 is a receptor for the chemokine Fractalkine/CX3CL1 whose expression is almost entirely restricted to myeloid cells. Heterozygous CX3CR1$^{+/eGFP}$ mutant mice which harbor a green fluorescent protein (eGFP) in the *cx3cr1* loci has become a valuable and widely used animal model to investigate microglial function (Jung et al., 2000). In most studies CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice are used instead of WT and there are only few reports describing the impact of CX3CR1 haplodeficiency on the microglia functions or reactions (Maggi et al., 2011; Reshef et al., 2014; Rogers et al., 2011). However, CX3CR1-Fractalkine interactions regulate microglia homeostatic functions and is involved in many brain functions, including hippocampal neurogenesis (Reshef et al., 2014; Sellner et al., 2016), synaptic maturation (Arnoux and Audinat, 2015), microglia chemotaxis (Zhang et al., 2012), or neuronal survival (Zujovic et al., 2001). CX3CR1 signaling in microglia also constitutes an important regulatory mechanism by which neuronally-derived CX3CL1 restrains microglia overactivation during various inflammatory conditions (Wolf et al., 2013). Conflicting consequences of CX3CR1 partial and complete deficiency on cognitive functions have been reported (Maggi et al., 2011; Reshef et al., 2014). Unsurprisingly, CX3CR1 pathway is also altered in AD: fractalkine signaling is deficient in AD patient brains (Cho et al., 2011) and the CX3CR1-V249I variant has been associated with a higher neurofibrillary pathology progression (Lopez-Lopez et al., 2018). However, its exact role remains uncertain, as complete deletion of CX3CR1 has either neuroprotective or neurotoxic effects (for review Guedes et al., 2018). A few studies reported effects of CX3CR1 haplodeficiency on pathological features in AD mouse models but these studies were limited in terms of features and of co-factors evaluated (Hickman et al., 2019; Lee et al., 2010; Liu et al., 2010).

By crossing the APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (afterwards referred to as AD-C57) and CX3CR1$^{eGFP/eGFP}$ lines, we generated the APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ line (afterwards referred to as AD-CX3) which represents a convenient model to study microglia during AD progression. Here, we validated this model by investigating in depth, whether CX3CR1 haplodeficiency has an impact on AD-like pathology progression. We analyzed the effects of this factor on cognitive behaviors, classic histological hallmarks of the disease (i.e. amyloid plaque burden, microgliosis and astrogliosis), as well as molecular changes (glial reaction and neuroinflammation). Impact of CX3CR1 partial deficiency may vary by stage of the disease or sex; the effects were thus evaluated in early, intermediate and advanced stages of the disease, in both males and females. Our findings confirmed that, compared to males, AD-C57 and AD-CX3 females display higher dense core plaques burden but we found that this is not associated with higher gliosis nor alteration of the neuroinflammation profile. Contrasting with the very recent study from Hickman et al. (Hickman et al., 2019), our findings indicate that CX3CR1 haplodeficiency has only limited impact on hallmarks of disease progression. Our analyses thus ascertain that APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice provide a relevant model to investigate the role of microglia in Alzheimer Disease initiation and progression.

2. Results

2.1. Sex but not CX3CR1 haplodeficiency affects learning performances in APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice

In AD-C57 mice, behavioral deficits emerge between 6 and 10 months of age and worsen with age (Minkeviciene et al., 2008). To measure the contribution of sex and CX3CR1 haplodeficiency in both AD and control (non-AD) mice on cognitive behavior, we assessed the visuo-spatial learning and memory in 12-months-old (mo) mice using the Morris water-maze test. Acquisition profiles were analyzed using a 4-way linear mixed-effects model (LMM) with sex (*Sex*), CX3CR1-haplodeficiency (*CX3-hdf*) and AD-status (*AD*) as between subjects' factors and training session (*Session#*) as within subjects repeated-measure factor. Regardless of the experimental group, all mice managed to learn the task (*Session#*: $p < 0.001$, LMM). Statistical analysis also revealed that after *Session#*, *Sex* was the factor that most affected the learning behavior (*Sex*: $p < 0.05$, LMM). Interestingly, sex seems to alter learning performances of controls but not AD mice (Figure-supp 2). Next analyses were thus performed separately on males and females using 3-way ANOVA (Fig. 1). In males, *AD* but not *CX3-hdf* has significant effects on the learning abilities with both AD-CX3 and AD-C57 mice showing learning deficits compared to their respective control littermates (Fig. 1C & 1E; *AD*: $p < 0.01$, LMM). There was also a significant contribution of the interaction between the 3 factors (i.e. *Session#*CX3*-hdf**AD*: $p < 0.01$, LMM) indicating that learning deficits are not strictly identical in AD-C57 and AD-CX3 male mice. Indeed, in the two last training sessions AD-CX3 mice performed better than AD-C57 (Fig. 1G). In females, only the *CX3-hdf* slightly affected the learning skills (*CX3-hdf*: $p < 0.05$, LMM); post-hoc analysis further revealed that this effect is mainly due to slightly better performances of controls-CX3 mice compared to their C57 counterpart (Fig. 1B).

Retention was tested 48h after the last training session, by assessing mouse ability to remember the location of the hidden platform. Results were analyzed using a 3-way LM model with *Sex*, *AD* and *CX3–hdf* as fixed factors. As sex did not significantly contribute to the model (*Sex*: $p = 0.683$, 3-way LM-model), results from both males and females were consolidated and analyzed using a 2-way ANOVA (Fig. 2A). As expected, contrary to controls, both AD-C57 and AD-CX3 mice did not properly discriminate the training quadrant, and meandered randomly in the pool (Fig. 2A-B). Two-way ANOVA post hoc analyses revealed that AD-CX3 mice performed significantly worse than their respective controls. The same trend was observed for C57 mice but difference did not reach statistical significance. Overall statistical analysis revealed that CX3-hdf did not affect mice memory (*CX3-hdf*: $p = 0.71$, 2-way ANOVA).

Of note similar results for learning and memory were obtained in the Barnes Maze test, another visuo-spatial memory test (Figure-supp 3A-E). These results were not due to altered exploratory behavior in AD mice as, on the opposite, we observed slightly increased locomotor activity in AD mice compared to controls in the open-field test (Figure-supp 3F; *AD*: $p < 0.05$, 3-way ANOVA; no difference in post hoc tests).

2.2. Sex and CX3CR1 haplodeficiency affect amyloid plaque load in a stage-dependent manner

Alzheimer Disease is characterized by specific histological and immuno-histological hallmarks. The most prominent feature, and a key pathogenic event in AD, is the presence of Amyloid-β (Aβ) deposits. To determine if *Sex*, *CX3-hdf* or interaction between these two factors alter AD-like pathology progression in APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice, we assessed plaques burden in the cerebral cortex of 4-, 8- and 12-mo mice. Thiazine Red (TR) was used to quantify plaques area fractions (Fig. 3) and the plaques densities (Figure-supp 4) in all experimental groups. As expected, no significant TR staining was observed in control mice brains (Figure-supp 4A-C). In 4-mo AD-mice only very rare plaques were detected, but stage-dependent increase in the plaques area fraction and

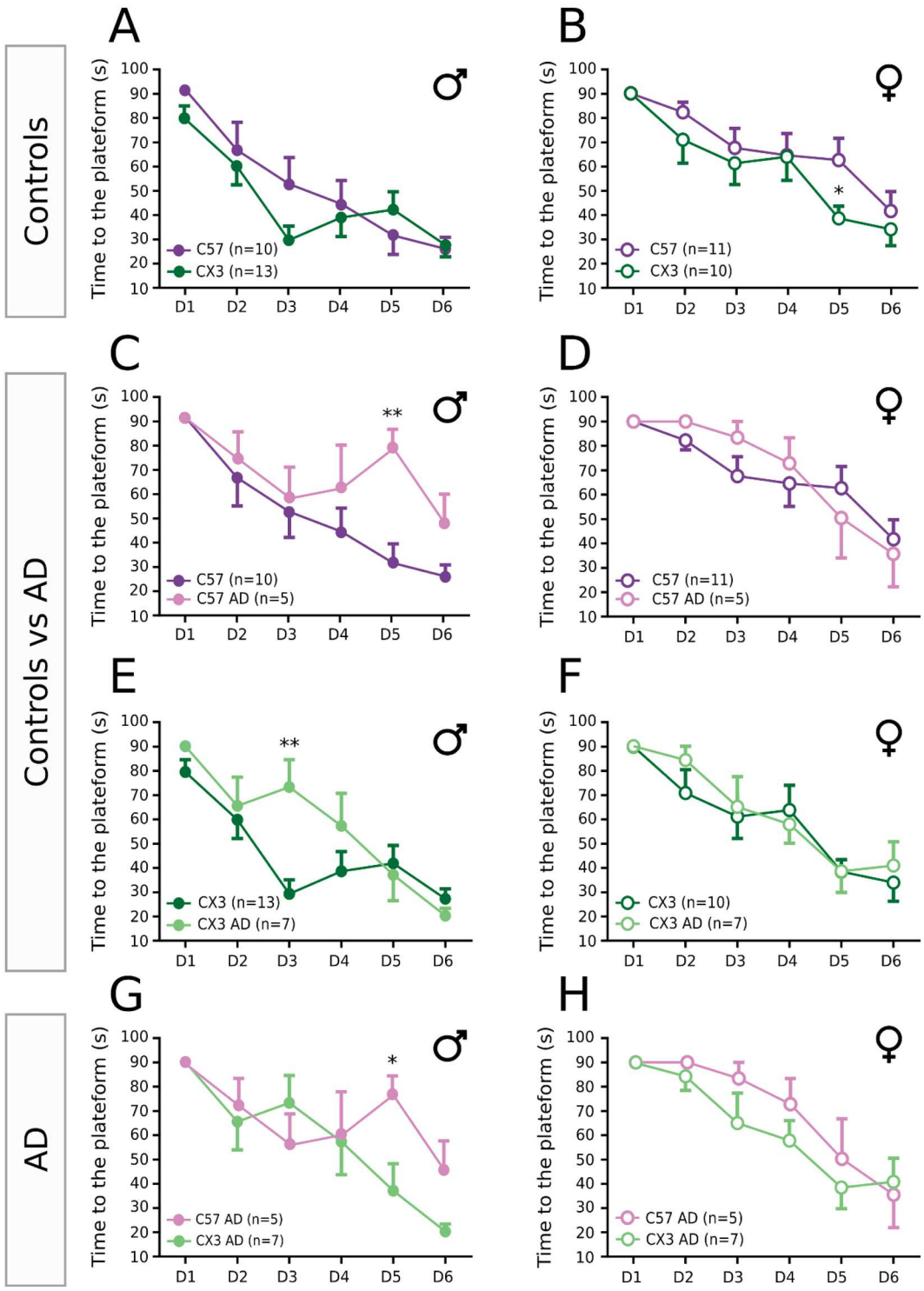


Fig. 1. In 12-mo mice, learning in the Morris Water Maze task is impacted by AD and to a much lesser extend by CX3CR1 haplodeficiency. Color code for the mouse genotypes are: C57BL6/J (C57; purple), APP/PS1:CX3CR1$^{+/+}$ (C57-AD; pink), CX3CR1$^{+/eGFP}$ (CX3; dark green) and APP/PS1:CX3CR1$^{+/eGFP}$ (CX3-AD; light green); plain and empty dots are for males and females respectively. Statistical analyses in males: 3-way ANOVA with *AD, CX3-hdf* as between subjects' factors and *Session#* as within subjects, repeated measures factor; *Session#*: $p < 0.001$; *AD*: $p < 0.01$; Statistical analyses in females: 3-way ANOVA with *AD, CX3-hdf* as between subjects' factors and *Session#* as within subjects, repeated measures factor factor; *Session#*: $p < 0.001$; *CX3-hdf*: $p < 0.05$. FDR corrected post-hoc tests; time point comparison: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Data are Mean ± SEM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

density was observed in all experimental groups (Fig. 3A-B and Figure-supp 4D). Results from quantifications were analyzed separately in controls and AD mice. Three-way ANOVA confirmed the prominent importance of the *Age* factor for amyloid plaque load in AD-mice (*Age*: $p < 0.001$). *Sex* and *Cx3-hdf* did not affect the plaque load ($p > 0.05$ each), but there was a significant effect of the interaction between the three factors indicating that *Sex* and *CX3-hdf* affect plaque load differentially depending on the stage of the disease. In 4-mo mice, all AD mice

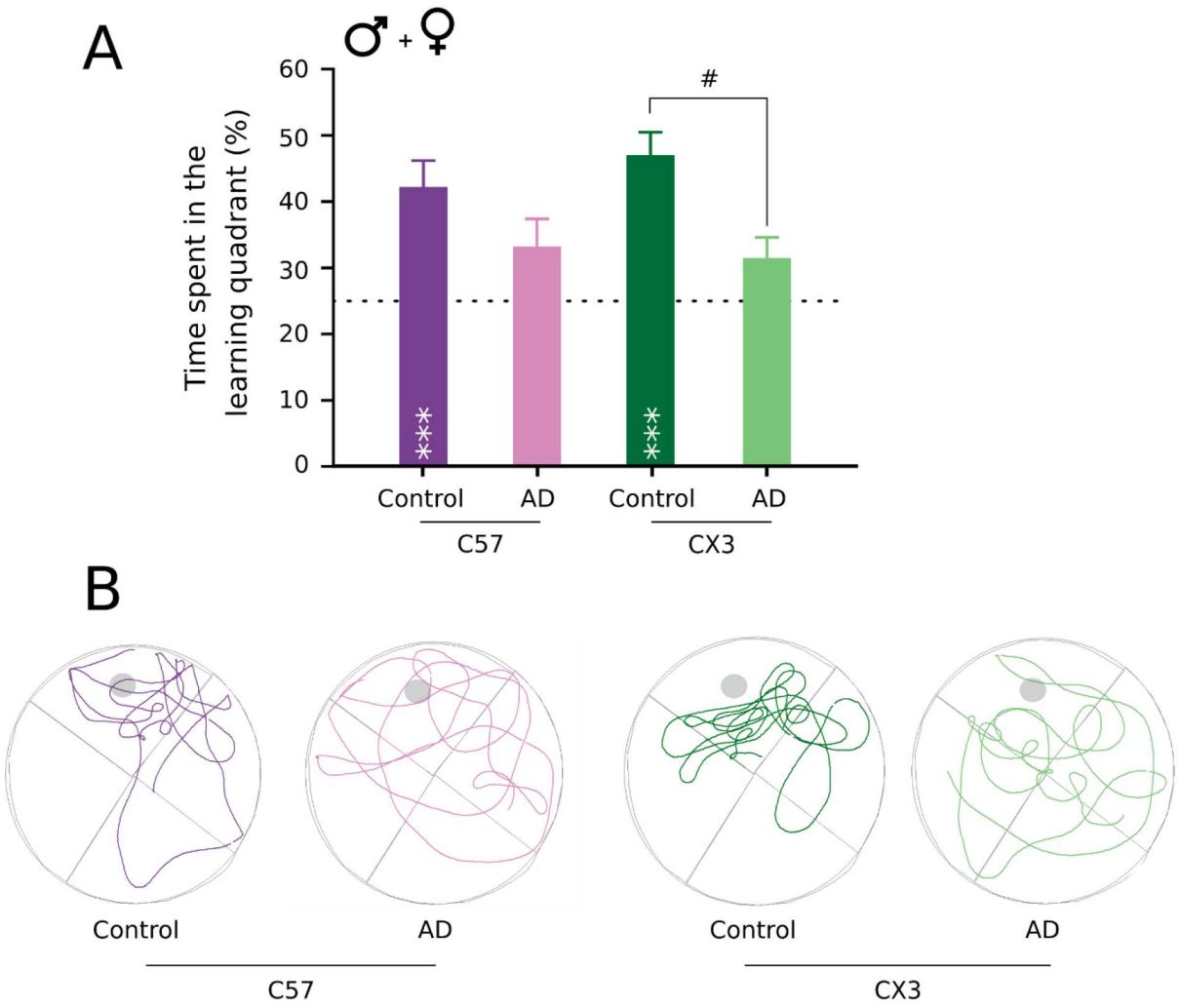


Fig. 2. 12-mo AD mice from both C57 and CX3 lines display memory deficit in the Morris Water Maze retention task. (A) Contrary to C57-AD (pink, n = 10) and CX3-AD (light green, n = 14), C57 (purple, n = 21) and CX3 (dark green, n = 23) control mice properly discriminate the learning quadrant. Data are Mean ± SEM. Statistical analyses for memory performance: Wilcoxon *t*-test: *** $p < 0.001$ compared to 25% theoretical value; Inter-group comparison: Two-way ANOVA with FDR corrected post-hoc tests: # $p < 0.05$. (B) Representative mice tracks during the retention task. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

presented the same plaque load. In contrast, 8-mo females displayed increased plaques load compared to males (*Sex*: $p < 0.001$; 2-way ANOVA on data in 8-mo mice), but, at this age, CX3-hdf factor did not alter this disease hallmark. Interestingly in these older mice, levels of soluble $A\beta_{1\text{-}40}$ and $A\beta_{1\text{-}42}$ was affected neither by sex nor CX3CR1 haplodeficiency (Figure-supp 4E) suggesting that higher plaques load in females is caused either by greater Aβ aggregation or increased Aβ production. In 12-mo mice, plaque load was affected by the interaction between *Sex* and *CX3-hdf* factors. It was increased in AD-CX3 male mice compared to their AD-C57 counterparts, while in females it was independent from CX3-hdf. Of note, we observed similar results for *Sex* or *CX3-hdf* effects in terms of disease progression over age, when measuring plaques densities (Figure-supp 4D).

2.3. Sex and CX3CR1 haplodeficiency have little impact on gliosis progression in $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$ mice

Increased microgliosis and astrogliosis are other important hallmarks of AD. To determine if CX3CR1 haplodeficiency and sex had any effect on microgliosis, we investigated microglial reaction by measuring IBA1 positive area fraction in mice cerebral cortex. Results from quantifications were analyzed separately in controls and AD-mice using 3-way ANOVA. In control mice, IBA1 area fraction was similar in males and females, was independent of CX3-hdf and remains stable until the mice are aged 12 months (Fig. 4A-B). In AD mice, no significant microglia reaction was detected at the early stage (i.e., 4-mo animals). However, from 8 months, we observed stage-dependent increase of microgliosis, with the *Age* factor displaying very significant effects (*Age*: $p < 0.001$; 3-way ANOVA; Fig. 4C-D). On the opposite, neither *Sex* nor *CX3-hdf* significantly contributed to the observed variance. Statistical analysis revealed a significant but dim interaction between the *Age* and *CX3-hdf* factors (*Age*CX3-hdf*: $p = 0.02$; 3-way ANOVA; Fig. 4D), with slightly increased microgliosis in 12-mo APP/S1:$CX3CR1^{+/eGFP}$ female mice compared to males.

In the cerebral cortex, homeostatic astrocytes express low levels of GFAP which remains almost undetectable by immunohistochemistry. Area fraction for this marker was used as a proxy to evaluate astrogliosis and to determine if age, sex or CX3CR1 haplodeficiency had any impact on astrocytes reaction. As for microgliosis, results from quantifications were analyzed separately in control and AD mice; 3-way ANOVA with *Sex*, *CX3-hdf* and *Age* as between subjects' factors were used. In control mice, GFAP immunoreactivity stayed globally stable across the ages. Statistical analysis revealed a dim effect of the interaction between the 3 factors (*Age*Sex*CX3-hdf*: $p = 0.016$; 3-way ANOVA) with slight

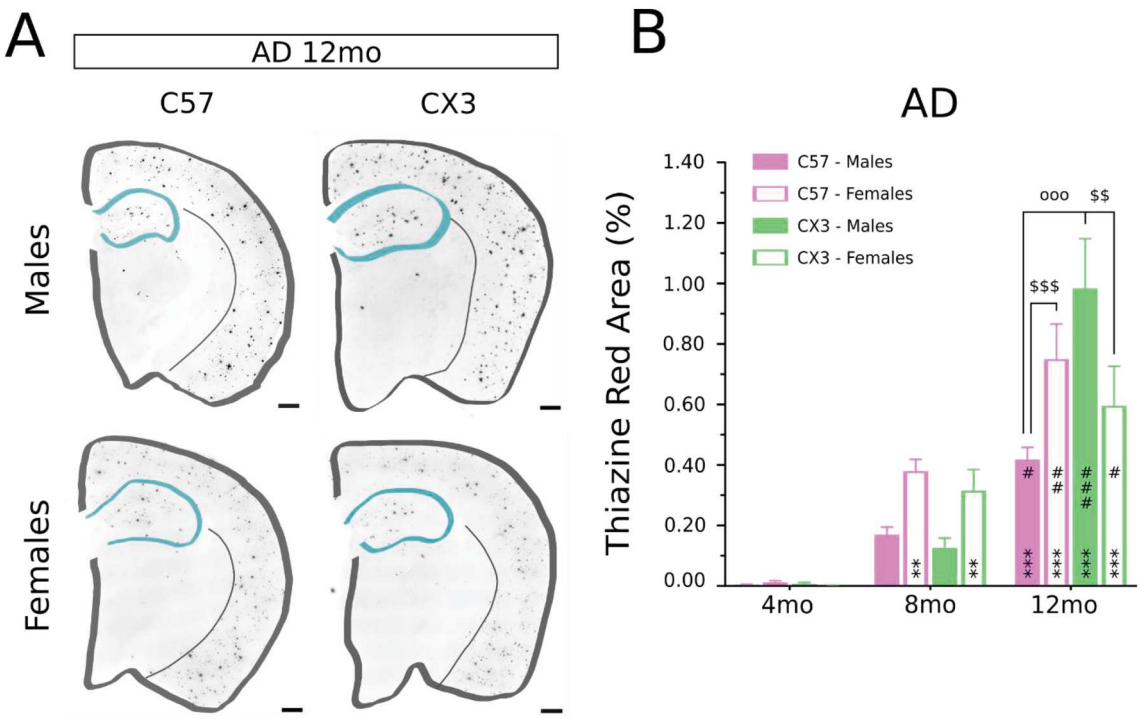


Fig. 3. Amyloid plaques load increase during AD progression: Sex and CX3CR1 haplodeficiency impact Aβ plaque load in an age/stage dependent manner. Representative Thiazine Red staining of 12-mo AD mice (A). Cortical and hippocampal contours are shown by grey and turquoise lines respectively, scale bar: 500 μm. Quantification of cortical Thiazine Red positive area (in % of total area) in AD mice (B) for both males (plain bars) and females (open bars) at the different ages. Data are Mean ± SEM. Statistical analyses: 3-way ANOVA with *Age*, *Sex*, *CX3-hdf* as between subjects' factors. AD-mice: *Age*: $p < 0.001$. FDR corrected post-hoc tests; compared to 4-mo: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; compared to 8-mo: # $p < 0.5$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$; *CX3-hdf* comparison: °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$; sexes comparison: $$ $p < 0.01$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

decrease in GFAP positive fraction in 12-mo females C57BL6/J compared to males (Fig. 5B). However, the contribution of this interaction to the global variance was <10%. Compared to control mice, 4-mo AD mice did not exhibit significant astrogliosis (Fig. 5D, analyses not shown). Increased astrogliosis was detected from intermediate stage (i.e., 8-mo mice) but stayed globally stable afterwards (*Age*: $p < 0.001$; 3-way ANOVA; Fig. 5D). Statistical analysis revealed that *CX3-hdf* had a significant (*CX3-hdf*: $p = 0.018$, 3-way ANOVA) but modest contribution (i.e., <5% of the global variance).

2.4. Sex and CX3CR1 haplodeficiency have little impact on the cortical neuroinflammation in $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$ mice

Microgliosis and astrogliosis occur late in AD progression. However, recent studies support that microglia and possibly astroglia reactions can arise already in the early AD stages. To determine if sex or CX3CR1 haplodeficiency could impact on the transcriptome remodeling in the cerebral cortex of AD-mice, we measured genes expression for 20 genes known to be deregulated under neurodegenerative conditions and/or specifically in AD. The majority of these genes are microglia specific and/or deregulated in reactive microglia (*Hexb, P2ry12, Ccl12, Ccl2, H2Aa, Cd68, Cd72, Cd86, Trem2, Tyrobp & Myd88*). We also included few neuroinflammation associated genes (*ApoE, Cxcl10, Il1b, Gfap & Tgfb*), as well as genes involved in APP processing (*Ctsd, Ide, Mme & Mmp9*). Gene expression changes and effects of *AD*, *Sex* and *CX3-hdf* fixed factors were analyzed individually at the different stages of the pathology using 3-way ANOVA. Complete results of these analyses are presented in Fig. 6 and Table S3. In addition, to get a global picture of gene expression changes we also performed complementary multivariate analyses at the different stages of the pathology.

In 4-mo mice, only few of the tested genes were significantly dysregulated. The most relevant effects (i.e., $p < 0.01$ and contribution to global variance higher than 15%) were an increased expression of *Cxcl10* in females but not males AD-mice and a decreased expression of *Mme* in controls $CX3CR1^{+/eGFP}$ mice. Consistent with these results, neither Principal Component Analysis (PCA) nor Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) managed to cluster the samples according to any of the fixed factor (Fig. 7A-B). Linear Discriminant Analysis (LDA) is complementary approach to PCA which focuses on maximizing the separability among known groups. Although samples tended to separate according to *Sex*, LDA also failed to clearly segregate the samples. In LDA analyses, cross-validation is a necessary step to determine the performance of a given predictive model, generated on a learning dataset, on new datasets. Here, two-fold cross validation indicated low model's performance as only 25% of the samples were correctly classified. As a whole, qPCR results indicated that, at 4-mo, genes expression are not affected by neither pathology, sex nor CX3CR1 haplodeficiency.

In 8-mo mice, pathology had significant impact on the expression of 60% (12/20) of the genes tested (Table S3) while *Sex* and *CX3-hdf* had much lower impact. Indeed, the most relevant effects were a slight decreased expression of both *Mme* and *Ide* in CX3CR1 haplodeficient mice. Consistent with these results, both PCA and AHC clustered samples in two groups corresponding to controls and AD mice (Fig. 7C-D), but none of these two analyses further discriminated for *Sex* nor *CX3-hdf*. PCA analysis revealed that leading genes for discriminating controls and AD samples are *Tgfb, Ctsd, Trem2, Gfap, Cd68* and *Tyrobp* (Fig. 7E). At this age, LDA clearly segregated controls from AD samples on the first component and there was also a trend for discrimination according to *CX3-hdf* on the second component. However, with about 35% of the samples with correct classification two-fold cross validation indicated low performance for this model (data not shown).

As expected, in 12-mo mice, *AD* factor affected the expression of almost all the genes we tested (17/20; Table S3). In contrast, *Sex* and *CX3-hdf* had no or little significant impact on gene expression.

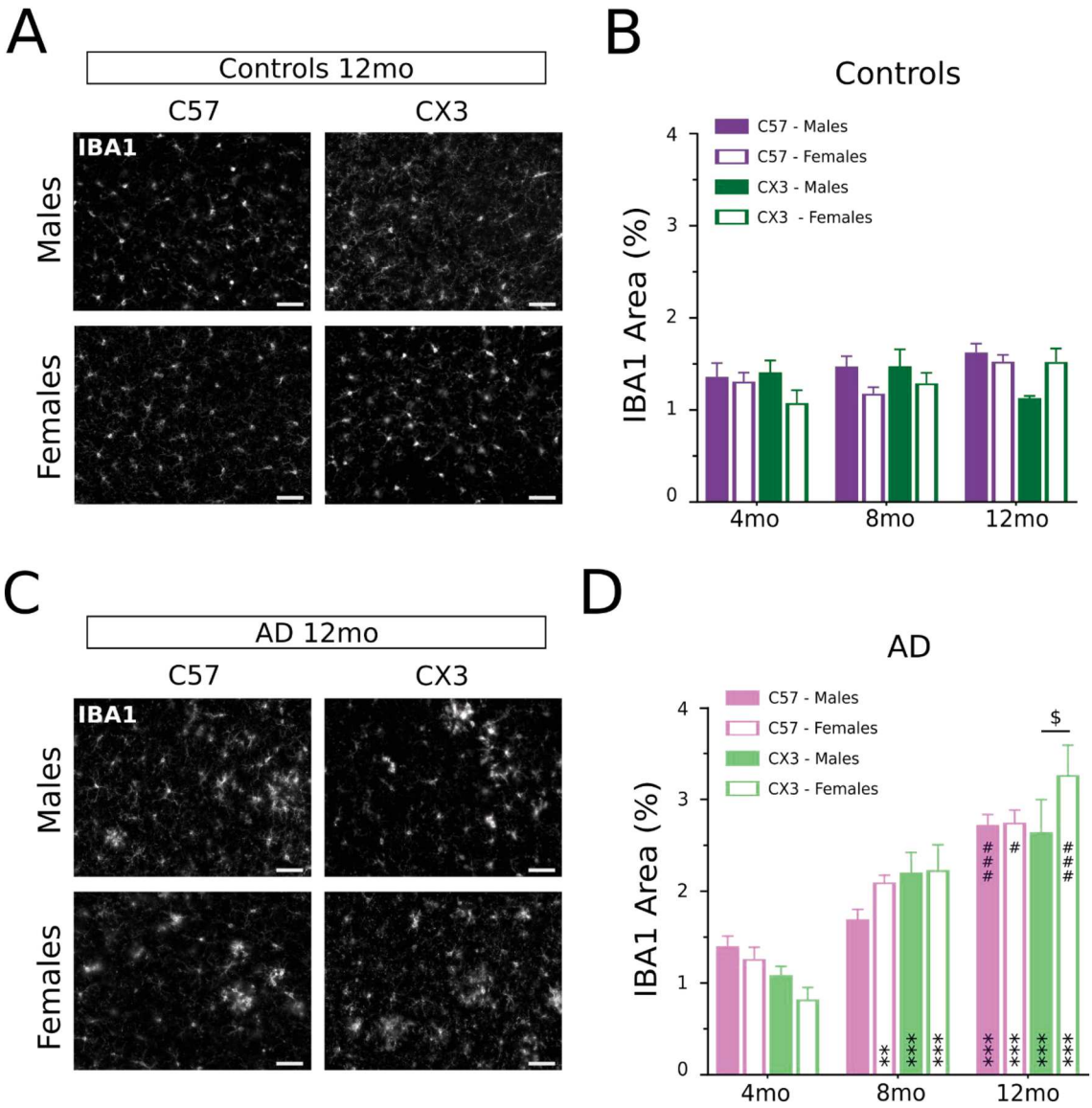


Fig. 4. Microgliosis increases during AD progression: sex and CX3CR1 haplodeficiency have little impact on the microgliosis in AD-mice. Representative IBA1 immunostaining in 12-mo control (A) and AD mice (C), scale bar: 50 μm. Quantification of cortical IBA1 fraction area in control (B) and AD-mice (D), for both males (plain bars) and females (open bars) at the different ages. Data are Mean ± SEM. Statistical analyses: 3-way ANOVA with *Age*, *Sex*, *CX3-hdf* as between subjects' factors. AD-mice: *Age*: $p < 0.001$. FDR corrected post-hoc tests; compared to 4-mo: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; compared to 8-mo: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$; sexes comparison: $ $p < 0.05$.

Accordingly, PCA and AHC appropriately segregated AD-mice from controls (Fig. 7F-G), but did not distinguish further for *Sex* and *CX3-hdf* factors. PCA analysis indicated that leading genes for discriminating controls from AD samples are *Cd68, Cd86, Cxcl10, Tyrobp, Gfap, Ctsd, Tgfb, Hexb* and *Ccl12* (Fig. 7H). Like PCA, LDA analysis segregated AD-mice from controls on the first component. However, two-fold cross validation indicated that the model led to a poor correct classification of the samples (i.e 30%). Of note we observed that, both in PCA and LDA, males AD-C57 samples tended to segregate from male AD-CX3 on the second component (i.e. plain pink dots versus plain green dots in Fig. 7F). However, the variance explained by the second component only represented 12.6% of the total variance and no specific gene could be associated with this discrimination.

As a whole, our qPCR analysis revealed that in early stage of the disease AD-like pathology, sex and CX3CR1 haplodeficiency have little impact on microglia reaction, neuroinflammation and pathways known to be altered in Alzheimer Disease. At more advanced stages, AD-like pathology leads to increased microglial response and neuroinflammation, but sex and CX3CR1 haplodeficiency have only very limited impact on this pathology driven features.

2.5. Complex impact of CX3CR1 haplodeficiency, age and AD-like pathology on the expression of Aβ degrading enzymes in APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice

Brain Aβ levels are partly regulated by Aβ degrading enzymes, including Insulin Degrading Enzyme (IDE or Insulysin), Neprilysin (MME) and Metalloproteinase-9 (MMP9). Progression of AD has been associated with reduced expression of theses enzymes in microglia resulting in decreased Aβ degradation and increased accumulation of the Aβ peptide (Hickman et al., 2008; Miller et al., 2003). Recently, Hickman et al. (Hickman et al., 2019) reported higher expression of *Ide* and *Mmp9*, but not *Mme* in the brains of APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice compared to that of APP^{swe}/PSEN1^{dE9}. We thus measured cortical RNA levels of the three enzymes and assessed the impact of the *AD*, *Sex* and *CX3-hdf* factors.

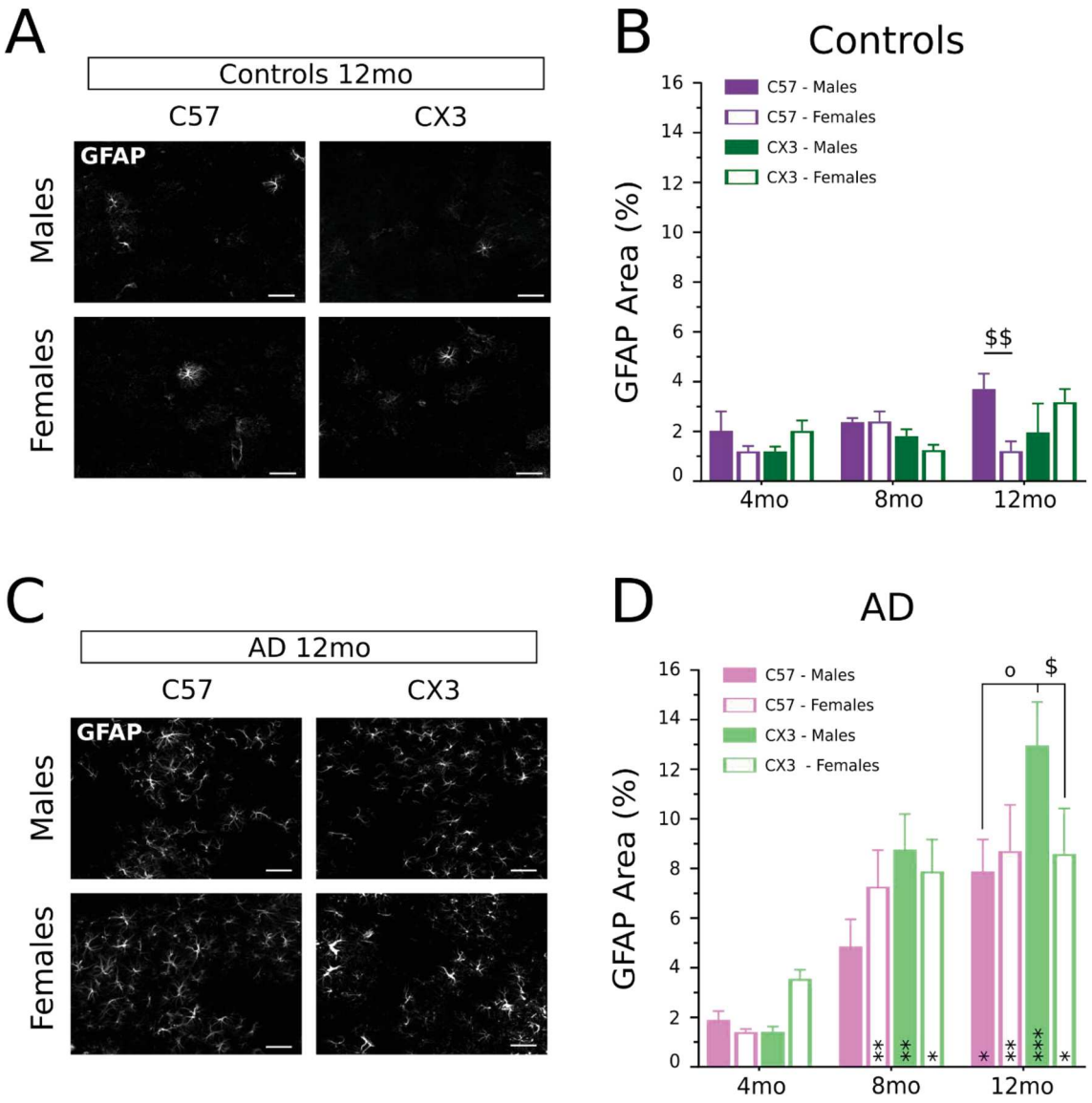


Fig. 5. Astrogliosis increases during AD progression: sex and CX3CR1 haplodeficiency have limited impact on the astrogliosis in AD-mice. Representative GFAP immunostaining in 12-mo control (A) and AD mice (C), scale bar: 50 μm. Quantification of cortical GFAP positive area (in % of total area) in control (B) and AD mice (D), for both males (plain bars) and females (open bars) at the different ages. Data are Mean ± SEM. Statistical analyses: 3-way ANOVA with *Age*, *Sex*, *CX3-hdf* as between subjects' factors. AD-mice: *Age*: $p < 0.001$; *CX3-hdf*: $p < 0.05$. FDR corrected post-hoc tests; compared to 4-month-old: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; sexes comparison: \$ $p < 0.05$; CX3-hdf comparison: 0 $p < 0.05$.

In contrast to Hickman's study and regardless of the mice age, we did not measure any significant reduction in *Ide* and *Mmp9* expression in the cortices of the AD-mice (Fig. 8A-F; Table S3). Our analysis also revealed that *Sex* did not impact significantly the expression levels of these two enzymes. However, in both 8- and 12-mo mice, we detected a decreased expression of *Ide* in CX3CR1 haplodeficient mice (Table S3; Fig. 8B-C).

Our results also indicated, in contrast to Hickman's results, a Sex and CX3-hdf independent decreased expression of *Mme* in 12-mo AD-mice (Table S3). Additionally, in 4-mo mice we measured higher *Mme* expression in controls CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice compared to either C57 controls and AD-CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice (Fig. 8G), while in 8-mo mice, CX3CR1 haplodeficiency led to AD independent *Mme* decreased expression. It should be noted that, although statistically significant, *Mme*'s expression varies at max by 30%. As a whole, these results suggest complex and tight CX3CR1, age and pathology dependent (but Sex independent) control of the expression of Aβ degrading enzymes in the brains of AD-57 mice.

3. Discussion

Numerous reports highlighted the importance of neuroinflammation in AD pathophysiology (Heneka et al., 2015), and recent GWAS and clinical imaging studies revealed its upstream role in the disease pathogenesis (Hampel et al., 2020). Microglia are the main immune cells in the brain. They play a key role in the immune surveillance of the brain parenchyma and initiate the inflammatory response when brain homeostasis is impaired, as it is the case when protein aggregates are formed. In AD, microglia are involved in both Aβ pathogenesis and in Tau pathology spreading (van der Kant et al., 2020) and thus represent an interesting therapeutic target. CX3CR1$^{+/eGFP}$ reporter mice provide useful tools to study microglia while preserving their *in vivo* physiological and pathophysiological functions. However, an important prerequisite to the use of this model is to demonstrate its relevance compared to the unaltered model. Here we provide a comprehensive study based on the assessment of multiple AD features (learning ability, histological hallmarks and neuroinflammation status), for both sexes

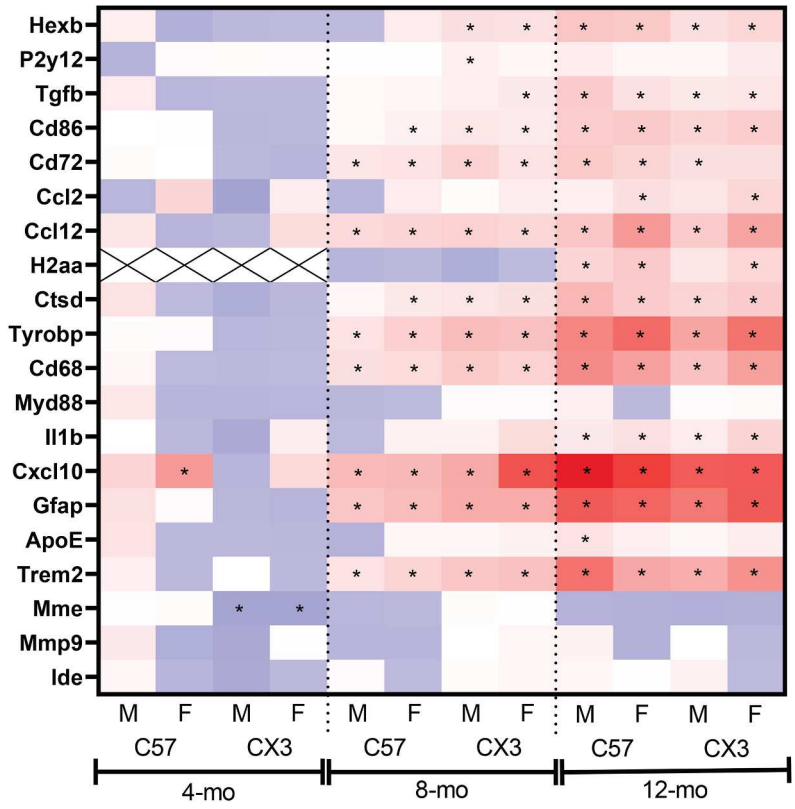


Fig. 6. Variation in the expression of selected genes across AD-like pathology. Heatmap showing expression fold-changes of selected genes. Genes were chosen from previous studies because they are (1) microglia specific and/or deregulated in reactive microglia (*Hexb, P2ry12, Ccl12, Ccl2, H2Aa, Cd68, Cd72, Cd86, Trem2, Tyrobp & Myd88*) (Hirbec et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017); (2) We also included few neuroinflammation associated genes (*ApoE, Cxcl10, Il1b, Gfap & Tgfb*) (Orre et al., 2014), as well as genes involved in APP processing (*Ctsd, Ide, Mme & Mmp9*) (Hickman et al., 2019). Statistical analyses: 3-way ANOVA FDR corrected post-hoc tests;*significant p-value compared to respective control.

and at different stages of the disease. It highlights the relevance of $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$:$CX3CR1^{+/eGFP}$ model to study the role of microglia in Alzheimer Disease initiation and progression.

AD is a progressive neurodegenerative disease that develops over years in humans and months in AD-mouse models. Recent data suggest that neuroinflammation, and microglia reaction in particular, occurs in two phases: an early phase, which initiates before cognitive deficits and is thought to have beneficial effects on the disease outcomes; and a second phase that contributes to increased neuroinflammation and neurotoxicity (Cuello, 2017; Fan et al., 2017). To our knowledge, our study is the first to present a thorough overview of the disease progression in $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$ mice (1) over different histological and molecular AD hallmarks, (2) in both sexes and (3) across three stages of the pathology. As attested by the absence of significant microgliosis, astrogliosis and change in the gene expression of a large range of inflammation related genes, our results demonstrate that in AD early stages, when plaques barely form, brain inflammation status is overall not different from that of control mice. As AD mice get older, hallmarks of the disease worsen: plaques burden increases in an age-dependent manner as do microgliosis and astrogliosis. Accordingly, we show an age-dependent increase of pro-inflammatory profiles in AD mice. This increase corresponds to both greater number of deregulated genes and stronger gene deregulation.

Sex effect in AD is well documented: prevalence is twice as high among women and higher longevity is not the only explanation (Hebert et al., 2013; Vina and Lloret, 2010). However, most AD pre-clinical studies use either males or females, but rarely both. In $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$, influence of sexual dimorphism was investigated in a handful of studies but they were mainly limited to mice at advanced stage of the disease (i.e., 12-mo or higher) and mainly focused on Aβ load (Gallagher et al., 2013; Janus et al., 2015; Jiao et al., 2016; Wang et al., 2003; Zhou et al., 2018). In parallel, a growing number of studies highlights the impact of sexual dimorphism on microglia functions (Bordeleau et al., 2019). In agreement with previous studies (Gallagher et al., 2013; Jiao et al., 2016; Wang et al., 2003), we confirmed that compared to males, female $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$ mice display greater plaques burden at both intermediate and advanced age but equal levels of soluble levels of $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-40}$. However, in contrast to Jiao et al. (Jiao et al., 2016), we found that higher plaques burden was not associated with increased gliosis. The weak effect of sex on the brain inflammatory status was confirmed by our transcriptomic analysis of a substantial number of inflammation related genes. Indeed, sex only affected the gene expression of a few genes, namely *Tyrobp* in 8- and 12-mo; *Cd86* in 8-mo and *Cd16* in 12-mo mice, and even for these few genes, impact on the global variance was weak (i.e., <10%). Additionally, the different multivariate analyses of our qPCR data failed to segregate males from females. Together, our results on plaques burden, soluble Aβ and neuroinflammation suggest that brain inflammatory status better correlates with soluble rather than aggregated Aβ concentration. This is consistent with data from the literature suggesting that non fibrillar soluble Aβ oligomers are more noxious than plaques aggregated Aβ fibrils (He et al., 2012). Effects of sex on learning impairment in $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$ mice have not been well documented and most studies either focused on one sex or males and females pooled in the same experimental groups (Janus et al., 2015). The most relevant study showed small deficits for 8/9-mo females $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$ in the Morris Water Maze reversal learning test (Gallagher et al., 2013), but no deficit in the training phase. Here we show that although both male and female quickly learned the task, learning abilities vary between males and females, with females showing a slower learning curve. Yet, we reveal spatial learning impairment in male but not female 12-mo AD-C57 mice. As for memory processes, they were not different in male and female controls and were similarly impaired in AD-C57 mice of both sexes. Overall, our data confirm the impact of the sex on the plaque load, but the lack of correlation between higher cortical Aβ deposition and neuroinflammation or behavioral deficits suggest that plaques load should not be used as a single marker to assess AD progression. Importantly, our study highlights the need to study progression of AD-like pathology in males and

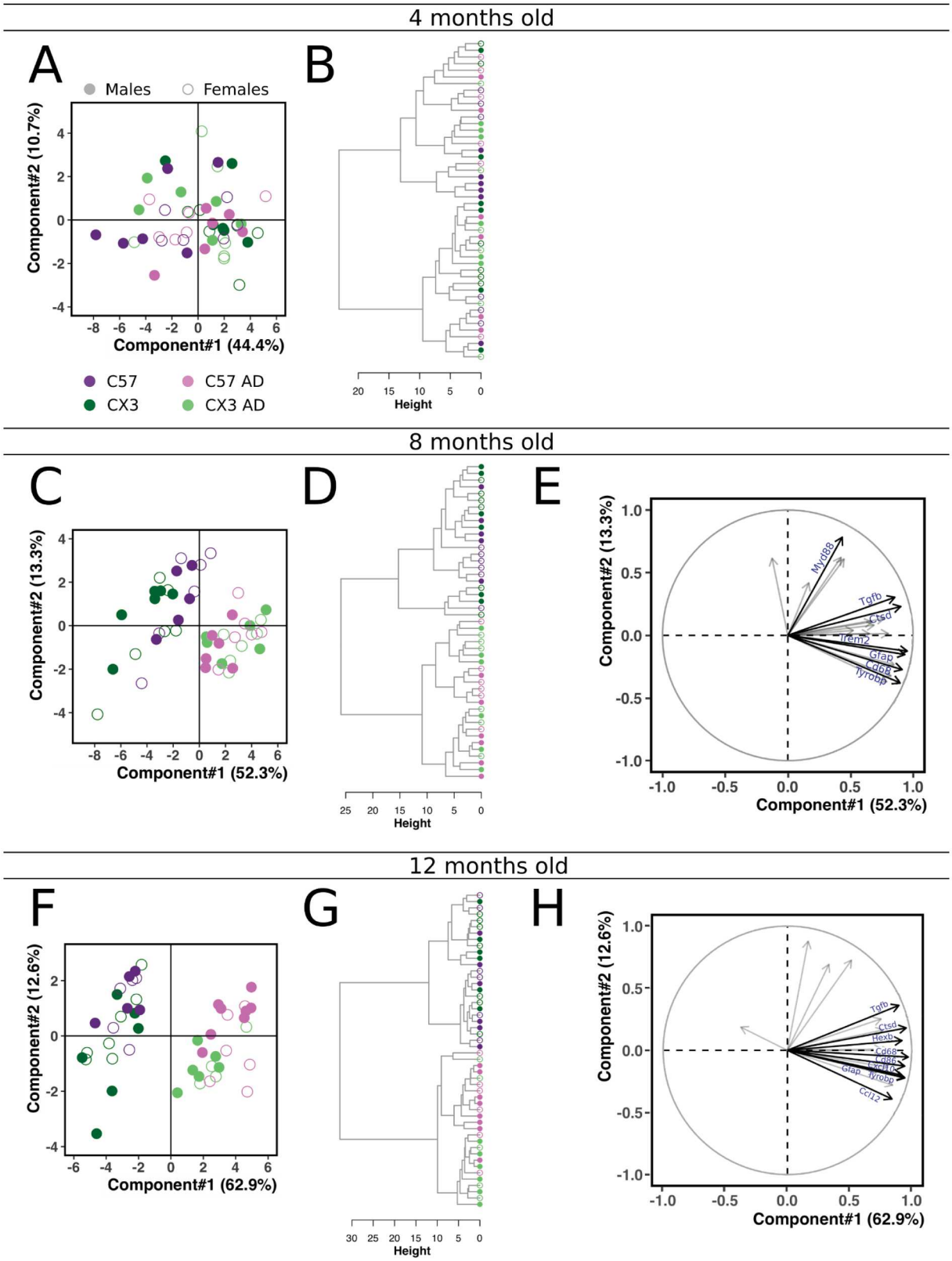


Fig. 7. Gene expression changes in the mice cortical homogenates for a range of inflammation and AD-related gens: Changes in gene expression were measured by qPCR in whole cortex, −ΔCq were calculated. Multivariate analyses were performed on −ΔCq. Gene expression is not significantly altered by sex, CX3CR1 haplodeficiency nor pathology in the early stage (A-B). In intermediate (C-E) and advanced (F-H) stages of the disease AD mice segregate from controls, but sex and CX3CR1 haplodeficiency does foster further segregation. In PCA, correlation circles allow identifying the most relevant variables for the separation of the observations on the different component/axes. Indeed, length of the vector, and closeness to the circle and the axe allows identifying the most relevant genes. In the present study, they (E-H) highlight the leading genes for segregation of AD versus control mice. Complete statistical results are given in Table S3. Included in these analyses are: Microglia related genes (*Hexb, P2ry12, Ccl12, Ccl2, H2Aa (except in 4mo), Cd68, Cd72, Cd86, Trem2, Tyrobp & Myd88*), neuroinflammation associated genes (*ApoE, Cxcl10, Il1b, Gfap & Tgfb*), and APP processing related genes (*Ctsd, Ide, Mme & Mmp9*).

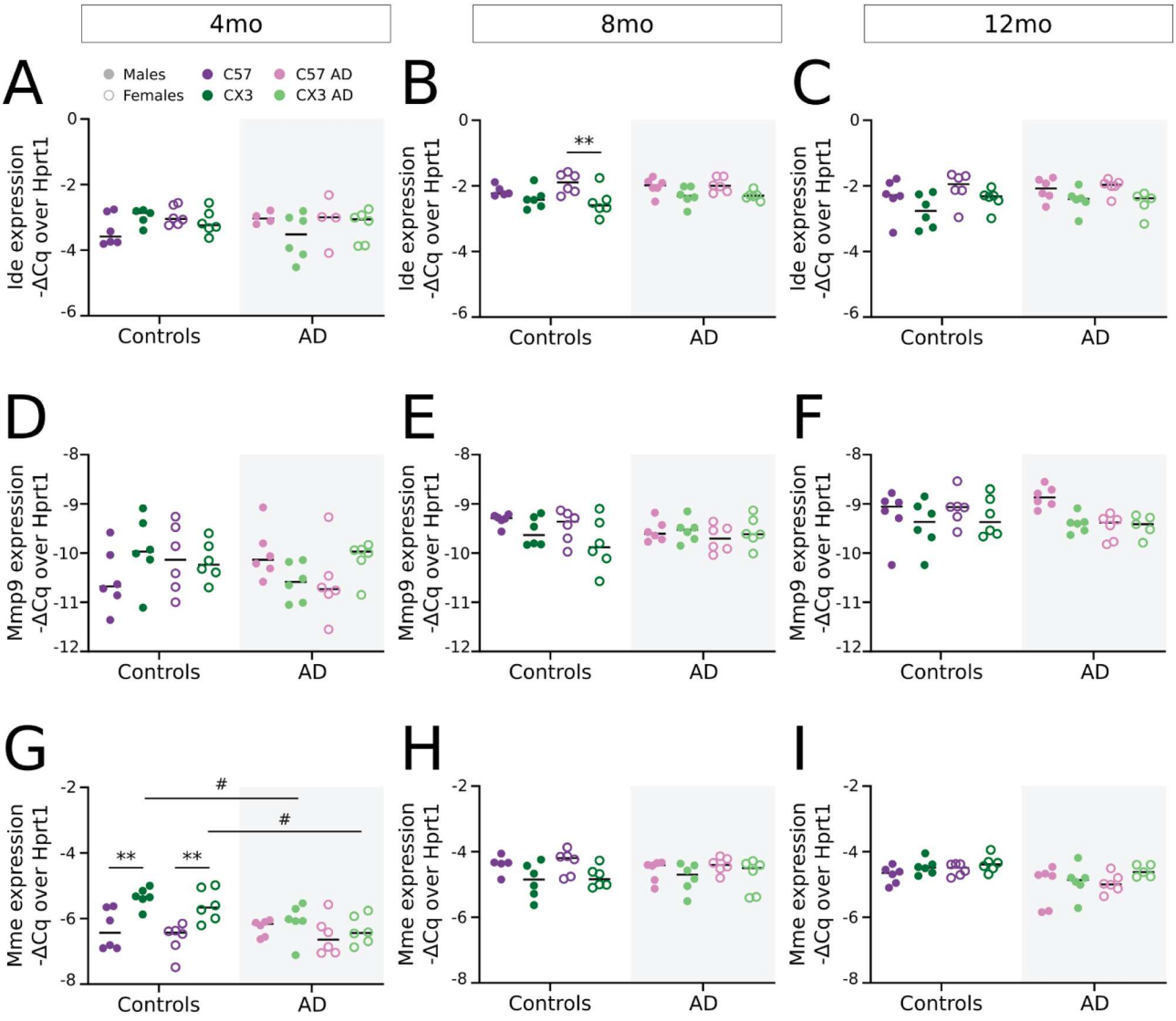


Fig. 8. *Ide*, *Mmp9* and *Mme*, APP degrading enzymes gene expression changes in mice cortical homogenates: Changes in gene expression were measured by qPCR in whole cortex and plotted as −ΔCq. Statistical analysis for each gene at every stage: 3-way ANOVA with *AD*, *Sex*, *CX3-hdf* as between subjects' factors. FDR corrected post-hoc tests; compared for AD status: # $p < 0.05$; CX3-hdf comparison: ** $p < 0.01$. Complete statistical results are given in Table S3.

females separately, using appropriate controls. The reason for higher plaque loads in female AD mice is currently unknown. Our qPCR analyses were limited to 20 genes and did not reveal any sex-difference in gene expression of Aβ degrading enzymes. Whether Aβ aggregation processes are increased in females, and whether microglia are involved in these processes remains to be explored. High-content approaches, such as RNA-seq, could be helpful in obtaining this information.

Our ultimate goal was to determine whether the $APP^{swe}/PSEN1^{dE9}$:$CX3CR1^{+/eGFP}$ mouse line could represent a relevant AD mouse model. To this purpose, we analyzed the impact of CX3CR1 haplodeficiency on AD progression. In AD mouse models, deletion of CX3CR1 had contrasting effects in different models: it reduced Aβ deposition, enhanced microglial Aβ phagocytosis and altered the neuroinflammation milieu in the APPPS1, R1.40 and CRND8 models (Lee et al., 2010; Liu et al., 2010), whereas in the hAPPJ20 and in the hTau models, it worsened the pathology by either increasing cytokine production (hAPPJ20; Cho et al., 2011) or Tau phosphorylation and aggregation (hTau, Bhaskar et al., 2010), and by exacerbating the behavioral deficits. Several AD mouse models have been crossed with the $CX3CR1^{eGFP/eGFP}$ line to investigate microglial functions in the context of AD (Baik et al., 2016; Gyoneva et al., 2016; Koenigsknecht-Talboo et al., 2008). However, only very few of these studies investigated the impact of haplodeficiency on the AD-like pathology progression (Hickman et al., 2019; Lee et al., 2010), and none explored its impact according to sex: Hickman's study focused on males, whereas in Lee's work the sex of the mice is not reported. At advanced disease stage, both studies described lower Aβ deposition in CX3CR1 haplodeficient mice, but results in terms of microgliosis, neuroinflammation and APP processing differs between the two studies. In agreement with Hickman et al. (Hickman et al., 2019), our learning and memory test analyses revealed slightly improved performance in 12-mo haplodeficient AD males compared to the AD-C57, with escape latencies similar to that of WT and $CX3CR1^{+/eGFP}$ mice in the two last training session. However, careful examination of the learning kinetics showed impairment for AD-CX3 in males compared to the appropriate controls. In our study, the slightly better cognitive performances of male AD-CX3 compared to males AD-C57 were associated with increase rather than decrease in plaques load and plaques densities. We also did not find any change in the expression of Insulin Degrading Enzyme (*Ide*) and Metalloproteinase-9 (*Mmp9*) genes in whole homogenates in either the AD versus controls, or $CX3CR1^{+/+}$ versus $CX3CR1^{+/eGFP}$ comparisons. Finally, we agree that CX3CR1 haplodeficiency does not affect microgliosis. The basis for the

contradictory results between our study and that of Hickman is not clear as the AD mouse models are similar (i.e. APP^{swe}/PSEN1^{dE9} on C57BL6/J background). However, stages at which some of the analyses were performed (i.e. *Ide*, *Mme*, and *Mmp9* expression) may partly explain some of the differences observed. In addition, microglia are very sensible to their environment, and change in microbiota for example has been shown affect microglial transcriptome (Erny et al., 2017; Thion et al., 2018). Thus, it is possible that some difference in environmental parameters between the two labs could explain at least some of the observed discrepancies. Although individual gene expressions were modestly affected by CX3CR1 haplodeficiency in 12-mo male AD mice, multivariate analyses revealed a tendency towards segregation of males AD mice as a result of their CX3CR1 haplodeficiency. This suggested that, in older males, partial CX3CR1 deficiency may have a subtle impact on the pathology. Although it does not lead to higher plaques load, nor increased soluble Aβ concentration, astrogliosis or microgliosis, this interaction between sex and CX3CR1 haplodeficiency in 12-mo males AD mice correlates with higher expression of the *hAPP^{swe}* and *hPS1^{dE9}* transgenes in the males C57-AD mice. Importantly, in the younger mice of both sexes and in 12-mo females, our study demonstrates that CX3CR1 haplodeficiency do not significantly affect plaques load, neuroinflammation or APP processing in the APP^{swe}/PSEN1^{dE9} model.

In summary, our study provides a comprehensive overview of the effect of the loss of one copy of the *Cx3cr1* gene on disease progression in the popular APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mouse model in both males and females. It reveals that, under our experimental conditions, CX3CR1 haplodeficiency does not significantly affect the evolution of the main hallmarks of the disease at early and intermediate stage of the pathology. The same is true at later stages in females. Overall, it demonstrates that the APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ line is a relevant and useful model to study the role of microglia in Alzheimer Disease. In addition, our study provides useful comparison of the disease progression between males and females.

4. Methods

4.1. Animals

The APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice used in this study co-express two genetic mutations associated with familial AD: a humanized amyloid precursor protein carrying the swedish mutation (APP^{swe}) and a mutant exon-9-deleted variant of the presinilin1(PS1^{dE9}). The APP and PSEN transgenes are integrated into a single locus and are expressed under the prion promotor (Jankowsky et al., 2004, 2001). These mice, thereafter referred to as APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, were purchased from the Jackson Laboratories and subsequently bred in the SPF animal facility of the Institute for Functional Genomic (IGF, Montpellier, France; Agreement from the Ministry of Agriculture N° D34-172-13) to a C57BL6/J background. CX3CR1$^{eGFP/eGFP}$ mice were generous gift from Dan Littman (Jung et al., 2000) and are also maintained in the IGF facility under the C57BL6/J background.

To generate the genotypes used in this study, heterozygous APP^{swe}/PSEN1^{dE9} male mice were crossed either with females C57BL6/J (purchased at Janvier Laboratories, France) or females $CX_3CR1^{eGFP/eGFP}$, to obtain respectively APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/+}$ and APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice, and their respective control littermates (i.e. C57BL6/J and CX3CR1$^{+/eGFP}$). For the sake of simplification, the different genotypes are referred to in the text and the figures as follows: C57/purple (C57BL6/J); CX3/Dark green (CX3CR1$^{+/eGFP}$), C57-AD/pink (APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/+}$) and CX3-AD/light green (APP^{swe}/PSEN1^{dE9}:CX3CR1$^{+/eGFP}$). C57 & CX3 are referred to as controls, and C57-AD & CX3-AD as AD-mice. Mice were housed in a 12 h light–dark schedule with food and water ad libitum. All experiments followed European Union (Council directive 86/609EEC) and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. The animal experiment protocols used in this study were approved by the Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Languedoc Roussillon (CEEA-LR; APAFiS#5252). Experiments were performed in 4-, 8- and 12-months-old (mo) animals. Males and females were used in parallel experiments. The experimenters were blind to group assignment.

The stability of expression of the endogenous *mApp* and *mPs1* genes *and* of the *hAPP^{swe}* and *hPS1^{dE9}* transgenes was tested for *Age*, *Sex* and *CX3-haplodeficiency* (*Cx3cr1-hdf*). Supplementary Fig. 1 shows that the expression of the endogenous *App* and *Ps1* transcripts is not affected by any of the factors. In 12-mo animals, statistical analyses revealed significant but small effects for some factors and interactions (i.e. representing <10% of the global variance). These were considered to be biologically irrelevant. Transgene expression was not affected by any of the factors in 4-mo animals, but 8-mo CX3-AD mice show slightly higher expression of *hAPP^{swe}* (*Cx3-hdf*: $p < 0.01$; 2-ways ANOVA; Fold Change (FC) = 1.25). On the contrary, in the oldest animals, expression of the transgenes was significantly higher in males, but not females, C57-AD mice (*hAPP^{swe}*: $p < 0.01$ post-hoc multiple comparisons, FC = 1.81; *hPs1^{dE9}*:, $p < 0.01$ post-hoc multiple comparisons, FC = 1.44). In CX3CR1$^{+/eGFP}$ mice, the expression of GFP is under the control of the Cx3cr1 promotor. In both 8- and 12-mo CX3-AD mice, the expression of the *Gfp* transcript was increased compared to the controls but this effect is probably due to the microgliosis observed at these ages.

4.2. Behavioral studies: Morris Water Maze

The Morris Water Maze allows testing long-term spatial memory. The mice were tested in a 140 cm diameter 40 cm height circular maze containing water at 20 ± 1 °C, opacified with lime carbonate. The light was adjusted to a non-aversive intensity of 80 lx. Fixed visual cues are displayed on distant walls around the maze for mice orientation. The protocol consisted of 6 days of learning during which mice had to locate and climb on an immerged platform always placed in the same quadrant, referred to as the training quadrant. For each trial mice started facing the wall from a randomly determined quadrant and were allowed to swim for 90 s. If the mice didn't reach the platform within the 90 s, they were gently placed on it for 20 s. Each mouse was given three trials per day with an inter-trial interval of 10 min. The escape time was calculated as the median latency of the three trials. The training phase was followed by a single probe test ("Retention test") performed 48 h after the last learning session, in the course of which the platform was removed. For the probe test, each mouse was allowed to swim once for 60 s. The trajectories were analyzed using videotracking (ViewPoint, Lissieu, France) and the time spent in each quadrant calculated. Mice failing to reach the platform at least once during the training sessions, whatever the experimental group, were discarded from the calculations. 10 mice over 78 were discarded accordingly (attrition 13%). Behavioral experiments were performed on 12-mo animals only. At least 5 mice were analyzed in each experimental condition, the numbers of mice are given in Table S1.

4.3. Tissue collection, preparation and staining

After induction of deep anesthesia with 2 μg/g pentobarbital (Euthasol Vet, TVM), the mice were perfused intracardially with 15 ml of phosphate buffer saline (PBS). For gene expression studies, the cortex was dissected, immediately frozen, and stored at –80 °C until use. For histological studies, the brains were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich, P6148) for 2 h at room temperature (RT) and then overnight at 4 °C in fresh 4% PFA. Fixed brains were stored at 4 °C in PBS containing 0.1% Sodium Azide until they were cut into 40 μm sections using a Vibratome (Microm Microtec, Brignais, France).

Thiazine Red Staining for Aβ plaques detection: Thiazine red (TR) is an analog of naphthol-based azo structures which binds β-pleated sheet structures. Like Thioflavin-S, it stains dense core plaques but with maximum emission at 580 nm (Luna-Munoz et al., 2008). Vibratome floating sections were briefly washed with PBS and incubated for 5 min

at RT with 16 mg/L Thiazine Red (TR; Sigma Aldrich, S570435) in PBS. After a final rinsing session, sections were then mounted using Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, S3023) and stored at 4 °C until imaging.

Immunohistochemistry: Vibratome floating sections were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies: Rabbit-IBA1 (1:2000, Wako, MNK4428) or Rabbit-GFAP (1:500, Sigma Aldrich, G3893) diluted in 2% BSA, 0.1% Triton X-100, PBS Solution. Sections were then rinsed 3 times with PBS and incubated for 2 h at RT with Goat anti-Rabbit Cy3 secondary antibody (1:500, Jackson, 111–165-144). After a final rinsing session, sections were then mounted using Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, S3023) and stored at 4 °C until imaging.

4.4. Images acquisition, sampling and quantification

Slides were viewed using a classical epifluorescence microscope and images were acquired using an Imager Z1 microscope (Zeiss) equipped with an AxioCam MR R3 camera. Depending on the staining, 10X/0.3M27 Zeiss Plan-Neofluar (Thiazin-red) or 20X/0.50 M27 Zeiss Plan-Neofluar (IBA1 and GFAP staining) air objectives were used. The experimenters were blind to group assignment.

Amyloid plaque load quantification: For amyloid plaque detection, exposure time was maintained the same for all the acquisitions (ie: Cy3 30 ms). Images were acquired in mosaic mode at 10X magnification to visualize both cortical and hippocampal regions. Brain regions were delimited under CFP fluorescence, and the number of TzR positive deposits and the TzR positive area were quantified in the cortex and the hippocampus using a custom ImageJ macro. For the size of the particle, a threshold was set to skip particles smaller than 25 μm. The plaques were counted if they had a circularity between 0.2 and 1. 6 slices per animal were analyzed. At least 4 mice were analyzed in each experimental condition, the numbers of mice are given in Table S1.

Microglial and Astrocyte quantification: For analysis of IBA1 staining, for each field, 11 images (corresponding to 10 μm-thick optical sections) were acquired. For analysis of GFAP staining, for each field, 5 images (corresponding to 4 μm-thick optical sections) were acquired. In both cases, the exposure time was maintained constant (IBA1, 80 ms and GFAP, 30 ms). Stacked images were projected on the Z-axis and analyzed using a custom ImageJ macro to determine the percentage of immunopositive surface. For each animal, quantifications were performed in 4–5 randomly selected fields per section and 5 sections per animal. At least 4 mice were analyzed in each experimental condition, the numbers of mice are given in Table S1.

4.5. Gene expression studies

RNA from cortices were extracted using the Qiagen RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, #74136) following manufacturer protocol. The quality of the total RNA was checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). All RNAs had RNA Integrity Numbers (RINs) higher than 8.0. Reverse transcription of 500 ng total RNA were performed using the iScript kit (BioRad). Real-time PCR was performed in 384-well plates in a final volume of 10 μl using SYBR Green dye detection on the LightCycler480 system (Roche-Diagnostic). The primers pairs were designed using Primer 3 software. Lists of genes analyzed and primers sequences are given in Table S2. All analyzed genes showed detectable expression levels. *Hptr1* was selected as normalizing gene and we verified at each run that it is indeed expressed at similar levels in all groups. The results were expressed as Cq and normalized to the Cq value of the *Hptr1* (–ΔCq). At least 5 mice were analyzed in each experimental condition, the numbers of mice are given in Table S1.

4.6. Statistics

In the present study, we considered that only strong and medium effect sizes would be biologically relevant, i.e. only for strong and medium effect sizes, it would be possible to confer the factors or their interactions an impact on the characteristics of the disease. As a result, our experiments were designed to detect at least medium effect size of the different factors and/or their interactions. Thus, sample size was determined for an effect size of 0.4 and an expected power of 80%. Post-hoc analyses revealed that for factors and interactions with p-values comprised between 0.05 and 0.1, the actual effect size were <0.3, thus validating our conclusions regarding the lack of effect of any factor/interaction.

All data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). They were analyzed using General Linear Model procedures and were subjected to two-, three- or four-way ANOVA to determine significant main effects and interactions. Softwares used for statistical analysis were R (four-way ANOVA) or GraphPad Prism (8.4) (two- and three-way ANOVA). Post-hoc analyses for multiple comparisons were performed with Benjamini, Krieger & Yekutieli False Discovery Rate (FDR) corrections. In the Morris Water Maze probe test, time spent in the training quadrant was compared to the theoretical value of 25% using the Wilcoxon signed ranked test.

In gene expression studies, Principal Component Analysis (PCA), Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) and Linear Discriminant Analysis (LDA) multivariate analyses were performed using dedicated R packages. Missing data represented <10% of the datasets, for analyses they were imputed using the R missMDA package. P-values smaller than 0.05 were considered significant.

5. Supplementary procedures

5.1. Behavioral analyses

Open-field: Mice were tested in a white arena (50 × 50 cm^2 and 45 cm height). The light was adjusted to a non-aversive intensity of 80 lx. The test consists of a single 10 min trial in which the mouse freely explores the environment. Analysis of trajectories was performed using the Videotrack® software (ViewPoint, Lissieu, France).

Barnes Maze: This test was used to assess spatial memory in a low stressful environment. The maze consists of a 120 cm elevated white flat circular platform (1 m of diameter) with 20 circular holes (50 mm of diameter) located equidistantly at the periphery of the platform. A hidden box located under one target hole allows the mice to escape from the platform. Fixed visual cues are displayed on distant walls around the maze for orientation. To motivate the mice finding the escape hole we used an aversive light stimulus of 370 lx and turned off the light as a reward. For each trial the mice were placed for 10 s in an opaque start box located in the center of the platform. To reduce mice stress, we performed a familiarization task 24 h prior to the first learning day. For the familiarization, after released from the start box, the mice were allowed to explore the maze once for 60 s and then gently placed in the hidden cage for 120 s with the reward. For the training trial, each mouse performed 4 trials per day with an inter trial interval of 15 min for 4 consecutive days. For each trial, after release from the start box, the mice were let to explore the maze for maximum 180 s. Trial was stopped when the mouse's four paws were in the target hole or when the maximum duration of the trial was reached. Mice that did not find the escape box within the 180 s were gently picked up and moved to the target hole, into the escape box. Mice were left in the escape box with the lights off for 60 s before being returned to their home cage. 72 h after the fourth training session we performed the retention test where the hidden cage was removed. We let the mice explore the maze once for 90 s and then returned to their home cage. The platform surface and holes were carefully cleaned with 20% ethanol solution and distilled water between each trial to remove any olfactory cues. All trials were recorded with an automated videotracking software (Ethovision® XT13, Noldus). Primary error (number of wrong pokes before poking the target hole), primary latency (time before poking the target hole), training latency

(time before entering the hidden cage) and time spent in the target quadrant were measured.

5.2. Quantification of Aβ1-42 and Aβ1-40

ELISA were performed only in 8-mo mice. All the steps were performed in LoBind tubes to limit loss of amyloid peptides. Homogenization Buffer (HB) was 50 mM Tris-HCl (sigma, T2788), 1X Protease Inhibitor (ThermoFisher, A32961), 150 mM NaCl (Sigma, S5886), 1% Triton X-100 (Sigma, 066 K0089), pH 7.4. Cortex were weighted and the ratio tissue/ HB adjusted to 2.5 µg/ml. Samples were sonicated (7 pulses, 40% amplitude) in HB then centrifuged at 17,500 g, 4 °C for 20 min. Protein concentration in the supernatant (soluble fraction) was determined using BCA technique, and adjusted to 0.2 µg/µl using MSD Diluent 35. For Aβ species detection, the MSD multiplex Aβ 6E10 kit (MSD, K15200E) protocol was followed. Briefly, wells were incubated with Diluent 35 at RT for 1 h under agitation, then rinsed 3 times with 0.05% Tween-20 containing PBS (Washing Solution, WS). In each well, the Detection Solution (2% 6E10, 1% $A\beta_{1\text{-}40}$ blocker in Diluent 100) was added, followed by the samples. After 2 h incubation at RT under agitation, the wells were rinsed 3 times with the WS. Finally, 2X Read Buffer T was added and the plate was read on a MESO QuickPlex SQ 120 plate reader.

Funding

This work was supported by funding from France Alzheimer (Grant AAP 2013 _ MicroMalzh). The PhD funding of J. Hua was supported by the Labex ICST (ANR 11-LABX-0015).

Acknowledgements

We acknowledge Leportier M. and Dr Mesbah K. (RAM-iExplore plateform) for help with animal breeding; the imaging facility MRI (Dr Cau J.), member of the national infrastructure France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, «Investments for the future») for help with immunohistochemistry quantification; Drs Tiers L. and Lehmann S. (Laboratory of Biochemistry – Clinical Proteomic (LBPC) for help with MSD quantification. Drs Pisa L., Pastore M. and Reynes C. (StatAbio plateform, BCM, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France) for useful advice on statistical analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.021.

References

Arnoux, I., Audinat, E., 2015. Fractalkine Signaling and microglia functions in the developing brain. Neural Plast. 2015, 689404 https://doi.org/10.1155/2015/689404.

Baik, S.H., Kang, S., Son, S.M., Mook-Jung, I., 2016. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid beta in the brain of Alzheimer's disease mouse model. Glia 64, 2274–2290. https://doi.org/10.1002/glia.23074.

Bedner, P., Dupper, A., Huttmann, K., Muller, J., Herde, M.K., Dublin, P., Deshpande, T., Schramm, J., Haussler, U., Haas, C.A., Henneberger, C., Theis, M., Steinhauser, C., 2015. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. Brain 138, 1208–1222. https://doi.org/10.1093/brain/awv067.

Bellenguez, C., Grenier-Boley, B., Lambert, J.C., 2020. Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. Curr. Opin. Neurobiol. 61, 40–48. https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.024.

Bhaskar, K., Hobbs, G.A., Yen, S.H., Lee, G., 2010. Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 36, 462–477. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01103.x.

Bordeleau, M., Carrier, M., Luheshi, G.N., Tremblay, M.E., 2019. Microglia along sex lines: From brain colonization, maturation and function, to implication in neurodevelopmental disorders. Semin. Cell Dev. Biol. 94, 152–163. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.06.001.

Cho, S.H., Sun, B., Zhou, Y., Kauppinen, T.M., Halabisky, B., Wes, P., Ransohoff, R.M., Gan, L., 2011. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. J. Biol. Chem. 286, 32713–32722. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254268.

Cuello, A.C., 2017. Early and late CNS inflammation in Alzheimer's disease: Two extremes of a continuum? Trends Pharmacol. Sci. 38, 956–966. https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.07.005.

Erny, D., Hrabe de Angelis, A.L., Prinz, M., 2017. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. Immunology 150, 7–15. https://doi.org/10.1111/imm.12645.

Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Guell-Bosch, J., Villegas, S., 2017. Mouse models of Alzheimer's disease. J. Alzheimer's Dis JAD 57, 1171–1183. https://doi.org/10.3233/JAD-170045.

Fan, Z., Brooks, D.J., Okello, A., Edison, P., 2017. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. Brain 140, 792–803. https://doi.org/10.1093/brain/aww349.

Gallagher, J.J., Minogue, A.M., Lynch, M.A., 2013. Impaired performance of female APP/PS1 mice in the Morris water maze is coupled with increased Abeta accumulation and microglial activation. Neurodegener. Dis. 11, 33–41. https://doi.org/10.1159/000337458.

Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N.G., Holtman, I.R., Schlachetzki, J.C.M., Sajti, E., Jaeger, B.N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M.P., Pena, M., Adair, A., Gonda, D.D., Levy, M.L., Ransohoff, R.M., Gage, F.H., Glass, C.K., 2017. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. Science 356. https://doi.org/10.1126/science.aal3222.

Guedes, J.R., Lao, T., Cardoso, A.L., El Khoury, J., 2018. Roles of microglial and monocyte chemokines and their receptors in regulating Alzheimer's disease-associated amyloid-beta and tau pathologies. Front. Neurol. 9, 549. https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00549.

Gyoneva, S., Swanger, S.A., Zhang, J., Weinshenker, D., Traynelis, S.F., 2016. Altered motility of plaque-associated microglia in a model of Alzheimer's disease. Neuroscience 330, 410–420. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.061.

Hampel, H., Caraci, F., Cuello, A.C., Caruso, G., Nistico, R., Corbo, M., Baldacci, F., Toschi, N., Garaci, F., Chiesa, P.A., Verdooner, S.R., Akman-Anderson, L., Hernandez, F., Avila, J., Emanuele, E., Valenzuela, P.L., Lucia, A., Watling, M., Imbimbo, B.P., Vergallo, A., Lista, S., 2020. A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. Front. Immunol. 11, 456. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00456.

Hansen, D.V., Hanson, J.E., Sheng, M., 2018. Microglia in Alzheimer's disease. J. Cell Biol. 217, 459–472. https://doi.org/10.1083/jcb.201709069.

He, C., Han, Y., Fan, Y., Deng, M., Wang, Y., 2012. Self-assembly of Abeta-based peptide amphiphiles with double hydrophobic chains. Langmuir 28, 3391–3396. https://doi.org/10.1021/la2046146.

Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., Evans, D.A., 2013. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. Neurology. 80, 1778–1783. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5.

Heneka, M.T., Golenbock, D.T., Latz, E., 2015. Innate immunity in Alzheimer's disease. Nat. Immunol. 16, 229–236. https://doi.org/10.1038/ni.3102.

Hickman, S.E., Allison, E.K., Coleman, U., Kingery-Gallagher, N.D., El Khoury, J., 2019. Heterozygous CX3CR1 deficiency in microglia restores neuronal beta-amyloid clearance pathways and slows progression of Alzheimer's like-disease in PS1-APP mice. Front. Immunol. 10, 2780. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02780.

Hickman, S.E., Allison, E.K., El Khoury, J., 2008. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. J. Neurosci. 28, 8354–8360. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.

Hirbec, H., Marmai, C., Duroux-Richard, I., Roubert, C., Esclangon, A., Croze, S., Lachuer, J., Peyroutou, R., Rassendren, F., 2018. The microglial reaction signature revealed by RNAseq from individual mice. Glia 66, 971–986. https://doi.org/10.1002/glia.23295.

Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Borchelt, D.R., 2004. APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. Neurobiol. Aging 25, 885–892. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.09.008.

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

Janus, C., Flores, A.Y., Xu, G., Borchelt, D.R., 2015. Behavioral abnormalities in APPSwe/PS1dE9 mouse model of AD-like pathology: comparative analysis across multiple behavioral domains. Neurobiol. Aging 36, 2519–2532. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.010.

Jiao, S.S., Bu, X.L., Liu, Y.H., Zhu, C., Wang, Q.H., Shen, L.L., Liu, C.H., Wang, Y.R., Yao, X.Q., Wang, Y.J., 2016. Sex dimorphism profile of Alzheimer's disease-type pathologies in an APP/PS1 mouse model. Neurotox. Res. 29, 256–266. https://doi.org/10.1007/s12640-015-9589-x.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., Littman, D.R., 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. Mol. Cell. Biol. 20, 4106–4114.

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., Amit, I., 2017. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. Cell 169 (1276–1290), e1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018.

Koenigsknecht-Talboo, J., Meyer-Luehmann, M., Parsadanian, M., Garcia-Alloza, M., Finn, M.B., Hyman, B.T., Bacskai, B.J., Holtzman, D.M., 2008. Rapid microglial

response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice. J. Neurosci. 28, 14156–14164. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4147-08.2008.
Lee, S., Varvel, N.H., Konerth, M.E., Xu, G., Cardona, A.E., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T., 2010. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. Am. J. Pathol. 177, 2549–2562. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100265.
Liu, Z., Condello, C., Schain, A., Harb, R., Grutzendler, J., 2010. CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid-beta phagocytosis. J. Neurosci. 30, 17091–17101. https://doi.org/10.1523/jneurosci.4403-10.2010.
Lopez-Lopez, A., Gelpi, E., Lopategui, D.M., Vidal-Taboada, J.M., 2018. Association of the CX3CR1-V249I variant with neurofibrillary pathology progression in late-onset Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. 55, 2340–2349. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0489-3.
Luna-Munoz, J., Peralta-Ramirez, J., Chavez-Macias, L., Harrington, C.R., Wischik, C.M., Mena, R., 2008. Thiazin red as a neuropathological tool for the rapid diagnosis of Alzheimer's disease in tissue imprints. Acta Neuropathol. 116, 507–515. https://doi.org/10.1007/s00401-008-0431-x.
Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., Limatola, C., 2011. CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. Front. Cell. Neurosci. 5, 22. https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00022.
Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., Thiele, D.L., 2003. Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 6221–6226. https://doi.org/10.1073/pnas.1031520100.
Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H., Leguit, N., Glennon, J., Koistinaho, J., Banerjee, P., Tanila, H., 2008. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. J. Neurochem. 105, 584–594. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x.
Niu, H., Alvarez-Alvarez, I., Guillen-Grima, F., Aguinaga-Ontoso, I., 2017. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. Neurologia 32, 523–532. https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016.
Nordengen, K., Kirsebom, B.E., Henjum, K., Selnes, P., Gisladottir, B., Wettergreen, M., Torsetnes, S.B., Grontvedt, G.R., Waterloo, K.K., Aarsland, D., Nilsson, L.N.G., Fladby, T., 2019. Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum. J. Neuroinflamm. 16, 46. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1399-2.
Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Jansen, A.H., Kooijman, L., Bossers, K., Hol, E.M., 2014. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. Neurobiol. Aging 35, 2746–2760. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004.
Reshef, R., Kreisel, T., Beroukhim Kay, D., Yirmiya, R., 2014. Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal- but not olfactory bulb-related memory and neurogenesis. Brain Behav. Immun. 41, 239–250. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.009.
Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B. A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., Gemma, C., 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. J. Neurosci. 31, 16241–16250. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011.
Sellner, S., Paricio-Montesinos, R., Spiess, A., Masuch, A., Erny, D., Harsan, L.A., Elverfeldt, D.V., Schwabenland, M., Biber, K., Staszewski, O., Lira, S., Jung, S., Prinz, M., Blank, T., 2016. Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. Acta Neuropathol. Commun. 4, 102. https://doi.org/10.1186/s40478-016-0374-8.
Takatori, S., Wang, W., Iguchi, A., Tomita, T., 2019. Genetic risk factors for Alzheimer disease: emerging roles of microglia in disease pathomechanisms. Adv. Exp. Med. Biol. 1118, 83–116. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4_5.
Thion, M.S., Low, D., Silvin, A., Chen, J., Grisel, P., Schulte-Schrepping, J., Blecher, R., Ulas, T., Squarzoni, P., Hoeffel, G., Coulpier, F., Siopi, E., David, F.S., Scholz, C., Shihui, F., Lum, J., Amoyo, A.A., Larbi, A., Poidinger, M., Buttgereit, A., Lledo, P.M., Greter, M., Chan, J.K.Y., Amit, I., Beyer, M., Schultze, J.L., Schlitzer, A., Pettersson, S., Ginhoux, F., Garel, S., 2018. Microbiome Influences prenatal and adult microglia in a sex-specific manner. Cell 172 (500–516), e516. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.042.
van der Kant, R., Goldstein, L.S.B., Ossenkoppele, R., 2020. Amyloid-beta-independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurosci. 21, 21–35. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0240-3.
Verheijen, J., Sleegers, K., 2018. Understanding Alzheimer disease at the interface between genetics and transcriptomics. Trends Genet. 34, 434–447. https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.02.007.
Vina, J., Lloret, A., 2010. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. J. Alzheimer's Dis JAD 20 (Suppl 2), S527–S533. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100501.
Wang, J., Tanila, H., Puolivali, J., Kadish, I., van Groen, T., 2003. Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice. Neurobiol. Dis. 14, 318–327. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.009.
Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.W., Jung, S., 2013. Microglia, seen from the CX3CR1 angle. Front. Cell. Neurosci. 7, 26. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00026.
Zhang, M., Xu, G., Liu, W., Ni, Y., Zhou, W., 2012. Role of fractalkine/CX3CR1 interaction in light-induced photoreceptor degeneration through regulating retinal microglial activation and migration. PLoS One 7, e35446. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035446.
Zhou, C.N., Chao, F.L., Zhang, Y., Jiang, L., Zhang, L., Luo, Y.M., Xiao, Q., Chen, L.M., Tang, Y., 2018. Sex differences in the white matter and myelinated fibers of APP/PS1 mice and the effects of running exercise on the sex differences of AD mice. Front. Aging Neurosci. 10, 243. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00243.
Zujovic, V., Schussler, N., Jourdain, D., Duverger, D., Taupin, V., 2001. In vivo neutralization of endogenous brain fractalkine increases hippocampal TNFalpha and 8-isoprostane production induced by intracerebroventricular injection of LPS. J. Neuroimmunol. 115, 135–143. https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00259-4.

C

Liste de mes publications

* Co-Premiers auteurs

En cours de publication

Publication en lien avec ma thèse

2021

— **Hemonnot-Girard A-L** *, Valverde A. J *, Hua J, Delaygue C, Linck N, Maurice T, Hirbec H.
Brain Behavior and Immunity - Analysis of CX3CR1 haplodeficiency in male and female APPswe/PSEN1dE9 mice along Alzheimer disease progression
DOI :10.1016/j.bbi.2020.10.021

— *Mosser C-A, Garcia V, Arnoux I, Baptista S,* ***Hemonnot-Girard A-L****, Marchi N, Hirbec H, Audinat E*
Soumis chez Cell Reports - Microglial BDNF deficiency impairs the functional maturation of thalamocortical synaptic networks

— *Chevreau R *, Ghazale H *, Ripoll C *, Chalfouh C, Delarue Q,* ***Hemonnot-Girard A-L****, Hirbec H, Wahane S, Perrin F, Noristani H, Guerout N, Hugnot J-P*
Biorxiv - Reaction of ependymal cells to spinal cord injury : a potential role for oncostatin pathway and microglial cells

— **Hemonnot-Girard A-L** *, Meersseman C *, Linck N, Rey C, Lachuer J, Pastore M, Reynes C, Rassendren F, Hirbec H
En cours de soumission - Transcriptomic insights onto the relative contribution of parenchymal and amyloid plaques associated microglia to Alzheimer Disease progression

— ***Hemonnot-Girard A-L****, Garcia V, Linck N, Verdonk F, Leportier M, Ginsberg S, Janneteau F, Rassendren F, Maurice T, Hirbec H*
En cours de rédaction - Microglial heterogeneity in Alzheimer's disease early stage, focus on Clec7a functions

2020

— *Moutin E, Sakkaki S, Compan V, Bouquier N, Giona F, Areias J, Goyet E,* ***Hemonnot-Girard A-L****, Seube V, Glasson B, Benac N, Chastagnier Y, Raynaud F, Audinat E, Groc L, Maurice T, Sala C, Verpelli C and Perroy J*
Biorxv - Restoring Glutamate receptosome dynamics at synapses rescues Autism like deficits in Shank3-deficient mice.

— Moutin E, **Hemonnot. A-L**, Seube. V, Linck. N, Rassendren. F, Perroy. J, Compan. V.

Frontiers in synaptic neuroscience - Procedures for culturing and genetically manipulating murine hippocampal postnatal neurons
DOI :10.3389/fnsyn.2020.00019

2019

— **Hemonnot. A-L** *, Hua. J *, Ulmann. L, Hirbec. H.
Fronters in aging neurosciences - Microglia in Alzheimer disease : well-known targets and new opportunities
DOI :10.3389/fnagi.2019.00233

2018

— Brown. R, Lam. A, Gonzalez-Sulser. A, Ying. A, Jones. M, Chou. R, Tzioras. M, Jordan. C, Jedrasiak-Cape. I, **Hemonnot. A-L**, Abou Jaoude. M, Cole. A, Saito. T, Saido. T, Ribchester. R, Hashemi. K, and Oren. I
eNeuro - Circadian and brain state modulation of network hyperexcitability in Alzheimer's disease
DOI :10.1523/ENEURO.0426-17.2018
— Chastagnier. Y, Moutin. E, **Hemonnot. A-L**, and Perroy. J
Journal of Computational Neurosciences - Image processing for Bioluminescence Resonance Energy Transfer measurement – BRET-Analyzer
DOI :10.3389/fncom.2017.00118

D

Liste de mes présentations

2020

— Présentation orale
4ème meeting du CALM (Club Alzheimer de Montpellier)
Microglial diversity in Alzheimer's Disease early stages : a key to understand the disease initiation

2019

— Poster & Flash Talk - Prix 2ème place
Plan Fondation Alzheimer
Microglial diversity in Alzheimer's Disease early stages : a key to understand the disease initiation.
Hemonnot. A-L, Valverde. A, Meerssemann. C, Delaygue. C, Hua. J, Linck. N, Maurice. T, Verdonk. F, Rassendren. F and Hirbec. H
— Présentation orale
Center of Excellence in Neurodegeneration (CoEN)
Microglial diversity in Alzheimer's Disease early stages : a key to understand the disease initiation.
— Poster
Euroglia
Microglial diversity in Alzheimer's Disease early stages : a key to understand the disease initiation. **Hemonnot. A-L**, Valverde. A, Meerssemann. C, Delaygue. C, Hua. J, Linck. N, Maurice. T, Verdonk. F, Rassendren. F and Hirbec. H
— Poster
NeuroFrance
Microglial diversity in Alzheimer's Disease early stages : a key to understand the disease initiation.
Hemonnot. A-L, Valverde. A, Meerssemann. C, Delaygue. C, Hua. J, Linck. N, Maurice. T, Verdonk. F, Rassendren. F and Hirbec. H
— Présentation orale
Laboratories of Excellence (LabEX)
Microglial diversity in Alzheimer's Disease development and progression.

2018

— Présentation orale
Montpellier Neuroscience Day
Microglial diversity in Alzheimer's Disease development and progression.

— Poster - Prix 1ère place
3ème meeting du CALM (Club Alzheimer de Montpellier) -
Characterization of the microglial diversity in a mice model of Alzheimer's disease.
Hemonnot. A-L, Valverde. A, Meerssemann. C, Delaygue. C, Hua. J, Linck. N, Maurice. T, Rassendren. F and Hirbec. H

— Poster & Flash Talk - Prix 1ère place
Rencontres de l'école doctorale
Characterization of the microglial diversity in a mice model of Alzheimer's disease.
Hemonnot. A-L, Valverde. A, Meerssemann. C, Delaygue. C, Hua. J, Linck. N, Maurice. T, Rassendren. F and Hirbec. H

Implication de nouvelles cibles microgliales, *Cst7* et *Clec7a*/Dectin-1, dans le développement et la progression de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA), première cause de démence chez les personnes âgées, est une maladie neurodégénérative pour laquelle il n'existe toujours pas de stratégie thérapeutique efficace. Singulièrement, une grande partie des facteurs de risques des formes sporadiques de la MA sont associés à des gènes microgliaux.

Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes du cerveau, et jouent un rôle pivot dans les processus neuroinflammatoires. Néanmoins, leurs rôles dans les différentes phases de la MA, et en particulier durant la phase précoce constituant un enjeu thérapeutique majeur, restent encore très mal connus.

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont permis d'identifier deux cibles moléculaires particulières, *Cst7* et *Clec7a*, qui du fait de leur dérégulation précoce et de leurs rôles à la périphérie (production de cytokines, phagocytose et dégradation de protéines) représentent des cibles pertinentes dans les phases précoces de la MA.

Les objectifs de mon projet de thèse ont donc été : (i) de caractériser le modèle d'étude $APP^{swe}/PS1^{dE9}$ au stade précoce ; puis (ii) de déterminer l'implication des deux cibles dans le développement de la MA et (iii) d'élucider leurs rôles microgliaux ; enfin (iv) j'ai cherché à démontrer l'intérêt de ces cibles chez l'Homme.

L'ensemble de ces travaux ont permis de démontrer l'existence d'une réaction microgliale précoce dans le modèle $APP^{swe}/PS1^{dE9}$ et de mettre en avant deux gènes microgliaux, pour l'instant peu étudiés, qui pourraient représenter des biomarqueurs précoces et/ou des cibles thérapeutiques innovantes.

- - - - - - - - - - - - - - -

Involvment of new microglial genes in Alzheimer's disease development, focus on *Cst7* and *Clec7a*/Dectin-1

Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. Effective threapeutics are still very needed for this neurodegenerative disorder. Interestingly, almost all risk genes for sporadic AD are highly expressed in microglia demonstrating their crucial role in this disorder.

Microglial cells are brain resident immune cells. They play pivotal roles in neuroinflammatory processes. However, whether microglia play beneficial and/or detrimental roles in AD progression remains heavily debated and, in addition, their roles in the early stages of the pathology are still poorly understood.

Previous study from our lab identified several microglial genes dysregulated in AD early stages. We focused our work on two main targets : *Cst7* and *Clec7a*. Indeed, while the microglial roles of these two genes are poorly known, their peripheral functions (cytokines production, phagocytosis and protein degradation) put them under the spotlight for early involvment in AD.

The main objectives of this thesis project were : (i) to caracterize AD early stage development in the $APP^{swe}/PS1^{dE9}$ model ; then (ii) to study the targets' implication in AD initiation, (iii) to unravel their microglial functions, and finally (iv) to demonstrate their relevance in Humans.

As a whole our data support an early contribution of microglia to AD progression in the $APP^{swe}/PS1^{dE9}$ mouse model and point to two specific genes that may represent potential early biomarkers and/or therapeutic targets.