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

En Biologie Santé

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

Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF)

Caractérisation et modulation du microbiote intestinal dans le contexte de la maladie d'Alzheimer : vers une nouvelle piste thérapeutique

Présentée par Caroline ISMEURT
Le 05 Novembre 2021

Sous la direction du Dr. Sylvie CLAEYSEN

Devant le jury composé de

Anne-Marie CASSARD-DOULCIER, Directrice de Recherche, INSERM, Paris	Rapportrice
David BLUM, Directeur de Recherche, INSERM, Lille	Rapporteur
Sylvie RABOT, Chargée de Recherche, INRAE, Jouy-en-Josas	Examinatrice
Benjamin LELOUVIER, Directeur Scientifique, VAIOMER, Labège	Examinateur
Simon GALAS, Professeur, Université de Montpellier, Montpellier	Président du jury
Sylvie CLAEYSEN, Chargée de Recherche, INSERM, Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont bien évidemment au Dr. **Philippe Marin** pour m'avoir accueillie dans son équipe dès mon premier stage dans le domaine de la recherche scientifique, et au Dr. **Sylvie Claeysen** pour m'avoir supervisée près de 5 ans maintenant dans ses projets de recherche. Sylvie je te remercie également car tu es une personne pleine de bon cœur, compréhensive et à l'écoute, aussi bien au niveau professionnel que personnel. Et surtout, je n'aurai jamais pensé que tu te serais autant battue pour que je puisse continuer ma thèse après ma première année. Sans toute cette énergie que tu as mise, je ne serais pas arrivée jusqu'ici. Un merci également au président de l'Université de Montpellier, **Philippe Augé,** d'avoir soutenu notre démarche et m'as ainsi permis de poursuivre mes recherches.

Je remerciement également chaleureusement **Anne-Marie Cassard-Doulcier** et **David Blum** qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, et **Sylvie Rabot**, **Benjamin Lelouvier** et **Simon Galas** pour leur rôle d'examinateurs. Sylvie, merci également pour l'organisation des deux Summer School qui ont été deux belles aventures très enrichissantes ! Et Simon merci également d'avoir participé à l'ensemble de mes comités de suivi individuel de thèse au cours desquels tu as été de bon conseil.

Je remercie également l'ensemble des **membres de l'équipe** : Dr. Carine Bécamel, Dr. Séverine Chaumont-Dubel, Dr. Marie-Laure Parmentier, Pr. Joël Bockaert, Dr. Eric Thouvenot, Dr. Franck Vandermoere, Anne et l'ensemble des étudiants, Angelina, Clara, Clémentine, Lucile, Manon, Alessandro, Tomas, Vincent. Un grand merci à **Louis-Antoine** (alias J.L.D d'après Nora) pour mes derniers mois de thèse où tu as été d'une aide précieuse avec un enthousiasme et une bonne humeur sans fin ! Un merci également au futur thésard à qui je vais léguer mon espace dans le bureau et le labo (désolé, tout est rose…) : **Thomas**, une belle rencontre, et comme j'aime bien me répéter : je serai là pour toi durant ta thèse si besoin ! Un remerciement particulier également à **Patrizia** qui a été la première personne à me former, et à **Emilie** pour nos longues discussions sur nos projets mutuels, tu as été d'une grande aide.

Je n'oublie pas ceux qui « travaillent dans l'ombre », c'est à dire l'ensemble des **services communs** de l'institut. Un remerciement particulier à **Akli** et **Manu**, je pense que dès que vous nous voyez arriver dans votre bureau vous avez peur de nous entendre dire qu'on redéménage l'animalerie. Vous avez été d'une grande aide pour ces changements de dernière minute, et se fut un plaisir d'avoir pu apprendre à vous connaitre durant ces travaux. Une

pensée également aux **gardiens** de l'institut, c'est toujours un plaisir d'avoir un sourire et une bonne humeur de votre part en arrivant sur site. Je n'oublie pas non plus l'ensemble de l'équipe de **l'animalerie** avec un remerciement spécial à **Luc** qui fut une très belle rencontre !

A un niveau plus personnel, je tiens à remercier le producteur de tabac Rasta, mes poumons ne t'apprécient guère, mais tu m'auras énormément aidé à me calmer. Un remerciement également, qui peut paraître étrange certes, au virus de la Covid-19, qui en entraînant un premier confinement m'aura permis de me recentrer sur moi-même et de démarrer l'écriture tant redoutée de ce manuscrit. Je remercie **Pepito** d'avoir été présent pendant si longtemps (#la voiture embourbée dans la boue) ; **John** alias Lapin 🐇 : une rencontre particulière, où je ne savais jamais à quoi m'attendre en ouvrant la porte de la colloc (tu sais de quoi je parle…R.I.P la table), je ne te souhaite que du bonheur dans tes projets futurs et de gravir toutes les montagnes que tu croiseras ; la fameuse **Popoch Pingu** (le couz pour les moins familiers) avec qui nos soirées hardstyle qui durent 24 heures ont toujours été du grand n'importe quoi ; mon entourage de festivals/soirée techno : le couple de **poney**, **Babou**, **Gros Yeux**, **Ramilson**, **Bac+5**, **Frère blond**, **Fodo** – je ne vous revois que très peu, mais j'ai rarement ressenti un si grand apaisement et bonheur que devant le son donc je vous remercie de m'avoir fait découvrir ce milieu qui m'a souvent permis de décompresser. Une pensée pour **Yann** alias Hérisson 🦔, car je vous ai rencontrés grâce à lui : tu auras toujours une place particulière, et ton « carosbeef » + « on est des vrais teufeuuuuurs » sont maintenant ancrés dans ma tête ! Un merci également à mon **Blondinet, Guigui**, **Glee**, **Mathious**, **Dadidou**, **Ma Biche** 🦌 (désolé j'étais obligée…), **Free Hugs**, **Nico** et **Seb** (l'inventeur officiel des soirées lights). Une pensée pour toi **JokSad** de la part de Charlotte : merci pour tout ; et à la rencontre avec **Victor**, une personne incroyable pleine de gentillesse (rendez-vous au Temple !). Merci à **Krys** (rogowstrikes !), un homme très particulier mais avec un grand cœur dans le fond. Un grand merci également à **Adrien**, aussi bien pour tous les thés que tu m'as payé, les grimaces non-voulues en mangeant des burgers, ton amour inconditionnel pour les « ceasar salad » et nos pauses commérages à rigoler pour rien, mais aussi pour tous tes conseils et les encouragements que tu m'as donnés, tu as été sans aucun doute une des plus belles rencontres dans l'institut. **Nora**, la positivité et la bonne humeur incarnée, un énorme merci pour tout ton soutien et ta présence pour toutes les situations possibles !

Je ne peux pas oublier **Jeannot**, une amitié inattendue, j'ai été ton « frérot » de galère pendant trois ans ; **Huguette**, je pourrais rédiger une thèse entière sur toi mais « l'amour, impossible à définir » sera amplement suffisant car tu sais déjà tout ; et enfin, Julien**, le garde du corps ou Stockholm,** une rencontre à 10h du matin dont on se souviendra toute notre vie, et dont le rire est absolument merveilleux.

Au niveau familial, merci à mon frère, **Jake** alias Brun, et à ma belle-sœur **Aurélie**, d'avoir été présents durant cette période, vous m'avez toujours soutenue à distance. *I'm gonna switch to English to thank another part of my family:* ***Karen****, you're an incredible aunt (not because you are the only one!) but because you are, as a Walmsley, a strong woman, always smiling and taking care of people; thank you for encouraging me despite the distance! "****Nana****", if you were still here, I know you would have gone to the bathroom just before my speech and so be late which would make me panic, fall asleep after 1mn43sc of listening to my presentation, and at the end say it was really interesting and that you are really proud of me! But I know that "♫ somewhere over the rainbow ♫" you are watching me.*

Last but definitely not least, I wouldn't have been able to get through all this without the unconditional support of my ***parents*** *since the beginning of my studies: on the one hand I had the "Walmsley support" with my mom, the strongest woman I know, who always told me to draw the positive from the negative, to never give up and that she always believed in me; and on the other hand, the "Ismeurt support" with my dad, the…. It's quite difficult to describe actually, but he enabled me to relax by saying "Don't bother, it's nearly finished". I'm really proud to follow in his steps as a future Doctor in science.*





FINANCEURS

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2) de Montpellier grâce à plusieurs financeurs que je souhaite remercier chaleureusement :

- Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) avec la société SynAging pour une durée de 1 an, transformée en contrat doctoral de l'Université de Montpellier (UM) pour les 2 années suivantes avec le soutien de Monsieur le Président Philippe Augé et de Monsieur Jacques Mercier, Vice-Président en charge de la Recherche
- Subvention de l'association France Alzheimer pour une durée de 1 an
- Subvention de la Caisse d'Épargne et du Club Soroptimist de Montpellier Métropole pour une durée de 2 mois

Les recherches effectuées au cours de ma thèse ont été financées par le Grand Programme Transversal Microbiote INSERM, par la Région Occitanie et le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) ainsi que par les dotations récurrentes du CNRS, de l'INSERM et de l'Université de Montpellier.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES **1**
LISTE DES TABLEAUX **2**
LISTE DES ABREVIATIONS **3**
AVANT-PROPOS **13**
INTRODUCTION **16**
I – Le microbiote intestinal, un organe à part entière **18**
1. Généralités sur le microbiote **18**
a. Un partenaire de longue date 18
b. Les différents types de microbiote humain 19
2. Le microbiote intestinal **20**
a. Un équilibre indispensable 20
i. Troubles métaboliques 20
ii. Troubles cérébraux 21
b. De la caractérisation du microbiote intestinal à son analyse 21
i. La métagénomique 21
La métagénomique bactérienne ciblée 22
La métagénomique globale 23
ii. La métabolomique 23
iii. L'analyse des données de métagénomique ciblée bactérienne 24
L'alpha diversité 24
La bêta diversité 24
L'abondance relative 25
Le LEfSe 25
c. Une vaste communauté 26
d. Un allié vital 28
i. Protection 28
Barrière microbienne et chimique 28
Barrière physique 28
Barrière immunologique 29
ii. Immunité 30
iii. Métabolisme 30
e. Une évolution constante 32
i. Facteurs affectant le microbiote intestinal 32
Facteurs externes 32
Voie d'accouchement et alimentation du nourrisson 32
Alimentation 32
L'âge 34
Usage d'antibiotique 34
Facteurs internes 34
Génétiques 34
Protéiques 35
ii. Modulation du microbiote intestinal 37
Prébiotiques 37
Probiotiques 37
Symbiotiques 38
Antibiotiques 38
Phagothérapie 38
Transplantation fécale 39
3. Environnement du microbiote intestinal **40**
a. Anatomie générale de l'intestin 40
b. Diversité cellulaire de l'épithélium 41
c. Réseau nerveux 41
i. Réseau intrinsèque 41
ii. Réseau extrinsèque 43
Fibres parasympathiques 43
Fibres orthosympathiques 44
d. Réseau immunitaire 45
e. Réseau glial 45

II – L'axe microbiote intestinal / cerveau 47
1. Voies de communication 48
a. Les acteurs microbiens et leurs cibles 48
i. Composants microbiens et leurs récepteurs 48
Les récepteurs PRR membranaires 49
Les « Toll-like receptors » 49
Les « C-type lectin receptors » 49
Les récepteurs PRR cytoplasmiques 49
Les « Nod-like receptors » 49
Les « Rig-1-like receptors » 50
ii. Métabolites bactériens et leurs récepteurs 52
Les acides gras à chaîne courte 52
Les acides biliaires 52
Le métabolisme du tryptophane 52
Les neurotransmetteurs 53
b. Microbiote et cellules endocrines 54
c. Microbiote et cellules immunitaires 55
d. Microbiote et cellules nerveuses 56
2. Microbiote intestinal et homéostasie cérébrale 58
a. Barrière hémato-encéphalique 58
i. Composition de la BHE 58
ii. Perméabilité de la BHE 58
iii. Modulation de la BHE par le microbiote intestinal 59
b. Neurotransmission 60
i. GABA 60
ii. 5-HT 61
iii. Catécholamines 61
c. Facteurs neurotrophiques 62
i. Qui sont-ils ? 62
ii. Le BDNF et le microbiote intestinal 63
d. Cellules gliales 64
i. Microglies et microbiote intestinal 64
ii. Astrocytes et microbiote intestinal 65
iii. Oligodendrocytes et microbiote intestinal 67
iv. Ependymocytes et microbiote intestinal 68
3. Microbiote intestinal et désordres cérébraux 70
a. Maladies psychiatriques 70
i. Caractéristiques générales 70
Dépression 70
Schizophrénie 71
Troubles du spectre de l'autisme 71
ii. Maladies psychiatriques et microbiote intestinal chez le rongeur 71
Preuves de concept 71
Humanisation 72
iii. Maladies psychiatriques et microbiote intestinal en clinique humaine 73
Caractérisation de la dysbiose intestinale 73
Modulation de la dysbiose intestinale 76
b. Maladies neurodégénératives 77
i. Caractéristiques générales 77
Sclérose en plaque 77
Huntington 78
Parkinson 78
ii. Maladies neurodégénératives et microbiote intestinal chez le rongeur 79
Preuves de concept 79
Humanisation 81
iii. Maladies neurodégénératives et microbiote intestinal en clinique humaine 82
Caractérisation de la dysbiose intestinale 82
Modulation de la dysbiose intestinale 82

III – Le microbiote intestinal, nouvelle piste thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer 85
1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer 85
a. Etiologie et facteurs de risque 85
b. Symptomatologie clinique 87
c. Évolution de la maladie et diagnostic 87
i. Stades cliniques 87
ii. Stades anatomiques 88
Hypothèse de Braak 88
Hypothèse de Thal 89
iii. Diagnostic 89
Biomarqueurs dans le LCS et dans le sang 89
Imagerie cérébrale 89
Évaluation cognitive 90
2. Neurophysiopathologie de la maladie d'Alzheimer 91
a. Marqueurs histopathologiques 91
i. Plaques amyloïdes 91
Métabolisme de l'APP 91
Voie amyloïdogène 91
Voie non-amyloïdogène 93
Clivages non-canoniques 93
Clivages subcellulaires 93
Fonction de l'APP et de ses produits de clivage 93
Peptides amyloïdes et agrégation 94
Propagation de la pathologie amyloïde 95
Pathologie amyloïde vasculaire 96
ii. Enchevêtrements neurofibrillaires 96
La protéine Tau 96
Hyperphosphorylation de Tau et agrégation 96
Propagation de la pathologie Tau 98
Fonctions de Tau 100
b. Marqueurs associés 100
i. Neuroinflammation 100
Microglie et astrocytes 100
Inflammasome et récepteurs microgliaux/astrocytaires 101
ii. Stress oxydant 102
Mitochondrie 102
Homéostasie calcique 103
Métaux 103
iii. Plasticité synaptique et neurotransmission 103
Perte synaptique 103
Neurotransmission 104
Les systèmes altérés 104
Les récepteurs couplés aux protéines G 105
iv. Epigénétique 106
3. Les modèles précliniques murins de la maladie d'Alzheimer 107
a. Les modèles de première génération - les modèles transgéniques 107
b. Les modèles de seconde génération - les modèles *knock-in* 107
c. Les modèles d'injections aigues 107
4. Stratégies thérapeutiques « centrales » 109
a. Pathologie amyloïde 110
i. Métabolisme de l'APP 110
ii. Anti-agrégants 111
iii. Immunothérapie 111
b. Pathologie Tau 112
i. Inhibition de l'hyperphosphorylation Tau 112
ii. Anti-agrégants 113
iii. Immunothérapie 113
iv. Reduction de Tau 113
c. Anti-oxydants et chélateurs de métaux 113
d. Neuroinflammation 114
e. Neurotransmission 114
Neurotransmission cholinergique 114
Neurotransmission glutamatergique 115

Neurotransmission sérotoninergique ... 115
f. Thérapie multimodale ... 116
g. Le passage de la barrière hémato-encéphalique ... 117
5. Stratégies thérapeutiques « périphériques » ... 119
a. Microbiote intestinal et maladie d'Alzheimer chez le rongeur ... 119
i. Preuves de concept ... 119
ii. Humanisation ... 121
b. Microbiote intestinal et maladie d'Alzheimer en clinique humaine ... 122
i. Caractérisation bactérienne ... 122
ii. Associations avec la sévérité de la pathologie ... 126
iii. Etudes cliniques ... 126
c. Le métabolome intestinal ... 127
i. Les acides gras à chaînes courtes ... 127
ii. Les triméthylamines ... 128
iii. Les dérivés du tryptophane ... 129
iv. Les acides biliaires ... 129
v. Les vitamines ... 130
d. La neuropathologie périphérique ... 131
i. Chez le rongeur ... 131
ii. En clinique humaine ... 132
e. D'autres acteurs périphériques ... 133
i. Les protéines Curli ... 133
ii. Les constituants membranaires des bactéries gram-négatives ... 134
iii. Un microbiote cérébral ? ... 134
Bactéries ... 135
Virus ... 135
Champignons ... 135
OBJECTIFS DE L'ETUDE ... 136
RESULTATS ... 138
LE MODELE MURIN D'AMYLOIDOSE 5XFAD ... 139
CARACTERISATION IN VIVO D'UN LIGAND MULTI-CIBLE ET ANALYSE DE SON EFFET SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL ... 141
MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR DES MODULATEURS MICROBIENS CLASSIQUES ... 146
MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR TRANSPLANTATION FECALE ... 167
DISCUSSION & PERSPECTIVES ... 186
ANNEXES ... 193
Publications ... 194
Communications orales ... 195
Posters ... 196
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 198

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Les hypothèses de la première colonisation bactérienne 19
Figure 2 – Les niveaux taxonomiques et le gène de l'ARN 16s bactérien 22
Figure 3 – Les analyses de métagénomiques ciblées 25
Figure 4 – Une vaste communauté 27
Figure 5 – Le microbiote et la barrière intestinale 29
Figure 6 – Le métabolisme bactérien 31
Figure 7 - Impact des émulsifiants alimentaires sur le microbiote intestinal 33
Figure 8 – Les facteurs affectant le microbiote intestinal 36
Figure 9 – Les techniques de modulation du microbiote intestinal 39
Figure 10 – Les couches composant la paroi intestinale 40
Figure 11 – La diversité cellulaire au sein de l'épithélium intestinal 41
Figure 12 – Le système nerveux entérique 42
Figure 13 – Le réseau extrinsèque de la paroi intestinale 44
Figure 14 – Les voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau. 47
Figure 15 – Les différents récepteurs PRR et leurs ligands 48
Figure 16 – Les voies de signalisation des récepteurs PRR menant à une réponse immunitaire 51
Figure 17 – Le métabolisme du tryptophane 53
Figure 18 – Modulation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique par un probiotique 60
Figure 19 – Modulation du BDNF hippocampique par un symbiotique 63
Figure 20 – L'absence de microbiote impacte la morphologie des cellules microgliales 65
Figure 21 - Les métabolites du tryptophane alimentaire contrôlent l'inflammation via les récepteurs AhR 66
Figure 22 – Modulation des protéines de la myéline par traitement antibiotique et métabolite bactérien 68
Figure 23 – L'influence du microbiote intestinal sur l'homéostasie cérébrale 69
Figure 24 – L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien 70
Figure 25 – Impact du microbiote intestinal dans les troubles du spectre autistique chez la souris 72
Figure 26 – Humanisation de rongeurs avec du microbiote de patients atteints de dépression 73
Figure 27 – Transplantation de microbiote fécal chez des enfants atteints de troubles du spectre de l'autisme 77
Figure 28 – Impact du microbiote intestinal dans la maladie de Parkinson chez le rongeur 80
Figure 29 – Humanisation de rongeurs avec du microbiote de patients atteints de la maladie de Parkinson 81
Figure 30 – Les gènes impliqués dans les formes familiales et sporadiques de la maladie d'Alzheimer 86
Figure 31 – Les stades cliniques et anatomiques de la maladie d'Alzheimer et les outils de diagnostic 88
Figure 32 – Imagerie cérébrale d'un sujet contrôle et d'une personne atteinte de la maladie d'Alzheimer 90
Figure 33 – Métabolisme de l'APP 92
Figure 34 – Formation des plaques amyloïdes 95
Figure 35 – Isoformes de Tau et déstabilisation microtubulaire par l'hyperphosphorylation de Tau 97
Figure 36 – Transfert transcellulaire de la protéine Tau 99
Figure 37 – Voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G 105
Figure 38 – Agents en essais cliniques pour traiter la maladie d'Alzheimer en 2021 109
Figure 39 – Les différentes approches d'une thérapie multimodale 117
Figure 40 - Diminution de la pathologie amyloïde après traitement antibiotique dans trois modèles murins 119
Figure 41 – Modulation de la pathologie amyloïde chez des souris après transplantation de microbiote fécal 120
Figure 42 – Classification phylogénétique des bactéries modulées dans plusieurs maladies neurologiques 124
Figure 43 – Distribution de peptide amyloïde $A\beta_{42}$ dans l'estomac et l'intestin de souris 132
Figure 44 – Présence de dépôts amyloïdes intestinaux chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer 132
Figure 45 – Dépôts d'α-synucléine et de inflammation après exposition à des protéines Curli 134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Les différentes cellules endocrines intestinales et les hormones sécrétées 54
Tableau 2 – Les récepteurs aux neurotransmetteurs exprimés par le système nerveux entérique 57
Tableau 3 – Mécanismes de transport *via* la barrière hémato-encéphalique 59
Tableau 4 – Altérations bactériennes du microbiote intestinal dans les maladies psychiatriques 75
Tableau 5 – Altérations bactériennes du microbiote intestinal dans les maladies neurodégénératives 83
Tableau 6 – Fonctions physiologiques de la protéine APP et de ses produits de clivage 94
Tableau 7 – Récepteurs couplés aux protéines G dont la fonction est altérée dans la MA et couplage canonique 106
Tableau 8 – Liste non-exhaustive des modèles murins transgéniques générérés pour modéliser la MA 108
Tableau 9 - Altérations bactériennes du microbiote intestinal dans la maladie d'Alzheimer 123

LISTE DES ABREVIATIONS

A-B-C-D

4-EPS	4-ethylphenylsulfate
5-HT	5-hydroxytryptamine, ou sérotonine
5-HT_xR	Récepteur 5-HT de sous-type x
AAC	Angiopathie amyloïde cérébrale
ABCA7	*ATP binding cassette transporter 7*
ABI3	*ABI gene family member 3*
ACE	*Angiotensin-converting enzyme*
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACTH	*Adreno corticotropic hormone*
ADAM10	*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*
ADAS-Cog	*Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale*
ADGC	*Alzheimer's Disease Genetics Consortium*
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGCC	Acides gras à chaînes courtes
AhR	*Aryl hydrocarbon receptor*
AICD	*APP intracellular domain*
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AP-1	*Activator protein 1*
APH1	*Anterior pharynx defective 1*
APH1B	*Gamma-secretase subunit APH-1B*

APOE	*Apolipoprotein E*
APP	*Amyloid precusor protein*
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ASC	*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
ASO	*α-synuclein overexpressing*
ATP	*Adénosine triphosphate*
Aβ	*Amyloid*-β
BACE1	β-*site APP cleaving enzyme 1*
BChE	Butyrylcholinestérase
Bcl	β-*cell lymphoma*
BDNF	*Brain-derived neutrophic factor*
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CARD	*Caspase activation and recruitment domain*
CARS	*Childhood autistic rating scale*
CAS	*Catalytic active site*
CCK	Cholécystokinine
CCK_xR	Récepteur CCK de sous-type x
CD	*Corne dorsale*
CD33	*Cluster of differenciation 33*
Cdk5	*Cyclin-dependent kinase 5*
CE	Cellule endothéliale
CG	Centre germinatif
CLR	*C-type lectin receptor*
CMC	Sodium carboxymethylcellulose

CMT	Chloride de méthylthionine
CR1	*Complement-receptor 1*
CREB	*Cyclic AMP response element binding protein*
CRH	*Corticotropin releasing homorne*
CTF	*Ciliary neurotrophic factor*
CTFβ	*Carboxy-terminal fragment* β
CV	*Corne ventrale*
CVD	Complexe vagal dorsal
CX3C	Fractalkine
CX3CR1	Récepteur de la chimiokine CX3C
DAP	*Diaminopimelic acid*
DEAD	Motif asparagine-glutamine-alanine-asparagine
Dectin	*Dendritic cell-associated C-type lectin*

E-F-G-H

EAAT	*Excitatory amino acid transporter*
EAE	Encéphalomyélite allergique expérimentale
EC	*Enterochromaffin cell*
ECE	*Endothelin-converting enzymes*
ECL	*Enterochromaffin cell-like*
EOPS	*Exempt d'organisme pathogène spécifique*
ERK	*Extracellular signal-regulated kinase*
FAE	*Follicule associated epithelium*
Fc	Fragment cristallisable
FDA	*Food and Drug Administration*

FFAR	*Free fatty acid receptors*
FoxP3	Forkhead box P3
FXR	*Farnesoid X receptor*
GABA	*γ-aminobutyric acid*
GALT	*Gut-associated lymphoid tissue*
GDNF	*Glial cell line-derived neurotrophic factor*
GFAP	*Glial fibrillary acidic protein*
GIP	*Gastric inhibitory polypeptide*
GLP	*Glucacon-like peptide*
GLP_xR	Récepteur GLP de sous-type x
GPBAR	*G protein-coupled bile acid receptor*
GPR	*G-protein regulator*
GSK-3β	*Glycogen-synthase kinase-3*β
GSM	*γ-secretase modulator*
GSRS	*Gastrointestinal Symptom-Rating Scale*
GWAS	*Genome-wide association study*
HDAC	*Histone désacétylase*
hERG	*Ether-a-go-go-related gene*
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HILIC	*Hydrophilic interaction chromatography*
HMDB	*Human metabolome database*
HMP	*Human microbiota project*
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
HSPG	*Heparan Sulfate ProteoGlycan*
HSV	*Herpes virus*

HxR	Récepteur histamine de sous-type x

I-J-K-L

iE-DAP	*γ-d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*
IFN	*Interféron*
IgA	Immunoglobuline de type A
IGAP	*International Genomics of Alzheimer's Project*
IGF	*Insulin growth factor*
IGLE	*Intraganglionnic laminar ending*
IκB	*Inhibitor of nuclear factor kappa B*
IKK	*Inhibitor of nuclear factor-κ-B kinase*
IL	Interleukine
ILF	*Isolated lymphoid follicles*
IL-xR	Récepteur *inhibitor of nuclear factor-κ-B kinase* de sous-type x
IMA	I*ntramuscular array*
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
IPAN	*Intrinsic primary afferent neuron*
IPS-1	*IFN*-β *promoter stimulator I*
IRAK	*Interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRF	*Interferon regulatory factor*
IRM	Imagerie à resonance magnétique
IRS	Inhibiteur de la recapture de sérotonine
IRS-1	Insulin-receptor substrate 1
ITAM	*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*

LB	Lymphocyte B
LCS	Liquide cérébrospinal
LEfSe	*Linear discriminant analysis Effet Size*
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTD	*Long-term depression*
LTP	*Long-term potentiation*

M-N-O-P

MA	Maladie d'Alzheimer
mAChR	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine
MAG	*Myelin-associated glycoprotein*
MALT	*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein*
MAP	*Microtubule-associated protein*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MAPKKK	*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
MAVS	*Mitochondrial antiviral-signaling protein*
MBD	*Microtubule-binding domain*
MBP	*Myelin basic protein*
MCI	*Mild cognitive impairment*
MCM	*Multiple-compound medication*
MDA5	*Melanoma differentiation-associated protein 5*
MDP	*Muramyl dipeptide*
MetaHIT	*Metagenomics of the human intestinal tract*
mGluR	Récepteur au glutamate métabotropique

MIA	*Maternal immune activation*
miARN	Micro ARN
Mincle	*Macrophage-inducible C-type lectin*
MMP	*Matrix metalloproteinase*
MMSE	*Mini mental state examination*
MMT	*Multi-medication therapy*
MOG	*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*
MOBP	*Myelin-associated oligodendrocyte basic protein*
MP	Maladie de Parkinson
MTDL	*Multi-target-directed ligand*
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
Myd88	*Myeloid differentiation primary response 88*
nAchR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NEP	Néprilysine
NFT	*Neurofibrillary tangles*
NF-κB	*Nuclear factor-kappa*-B
NFL	Neurofilament à chaîne légère
NIH	*National Institutes of Health*
NLR	*NOD-like receptors*
NLRP3	*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
NMDA	*N-Methyl-D-Aspartic acid*
NMDX	Noyau moteur dorsal du nerf vague
NOD	*Nucleotide-binding oligomerization domain*
NOD	*Non-obese diabetic*
NPY	Neuropeptide tyrosine

NR1	Sous-unité 1 du récepteur NMDA
NS	Noyau solitaire
OAS	Oligonucléotide anti-sens
OGA	*O-linked-N-acetylglucosaminidase*
O-GlcNAc	*O-linked N-acetylglucosamine*
OLFR	*Olfactory receptor*
OTU	*Operational taxonomic unit*
$P2X_xR$	Récepteur purinergique de sous-type x
p75NTR	*p75 neurotrophin receptor*
P80	Polysorbate-80
PAM	Peptide anti-microbien
PANSS	*Positive and negative syndrome scale*
PAS	*Peripheral active site*
PEN-2	*Presenilin enhancer 2*
PET	*Positron emission tomography*
PHF	*Paired helical filaments*
PILRA	*Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha*
PKCδ	Protéine kinase C δ
PLCG2	*1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2*
Plp1	*Proteolipid protein 1*
PolyI:C	Polyinosinique-polycytidylique
PP2A	*Protein phosphatase-2*
PPI	*Pre-pulse inhibition*
PRR	*Pattern recognition receptor*
PSA	Polysaccharide A

PSEN	*Presenilin*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
PXR	*Pregnane X receptor*
PYY	Peptide tyrosine tyrosine

Q-R-S-T

RCPG	*Récepteur couplé aux protéines G*
RegIIIγ	*Regenerating islet-derived protein 3 gamma*
RIG1	*Retinoic-acid inducible gene I*
RIPK	*Receptor interacting protein kinase*
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RLR	*RIG-I-like receptors*
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	*Reactive oxygen species*
SAPK	*Stress activated kinase*
SFB	*Segmented filamentous bacteria*
SHARPIN	*SHANK-associated RH interacting protein*
Slc	*Solute carrier*
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SOCS2	*Suppressor Of Cytokine Signaling 2*
SOPF	*Specific and opportunistic pathogen-free*
SORL1	*Sortilin-related receptor 1*
Syk	*Spleen tyrosine kinase*
T2R	*Taste receptor type 2*

TAK1	MAPKKK7
TANK	*TRAF family member-associated NF-κ*B
Tau	*Tubulin-associated unit*
TBK1	*TANK-binding kinase-1*
TGFα	*Transforming growth factor α*
Th	*Lymphocyte T helper*
TIR	*Toll-interleukin receptor*
TLR	*Toll-like receptor*
TMAO	*Trimethylamine-N-oxide*
TNF	*Tumor necrosis factor*
TNF_xR	Récepteur TNF de sous-type x
Tph1	*Tryptophane hydroxylase de type 1*
TRAF	*TNF receptor-associated factor*
Treg	Lymphocyte T regulateur
TREM2	*Triggering receptor expressed on myeloid cell 2*
TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-*β
TrkB	*Tropomycin receptor kinase B*
TSA	*Troubles du spectre de l'autisme*

U-V-W-X-Y-Z

UTR	*Untranslated region*
VEGF-B	*Vascular endothelial growth factor B*
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	*Wild-type*
Y_xR	Récepteur NPY de sous-type x

AVANT-PROPOS

La maladie d'Alzheimer est la première cause de démence au niveau mondial. C'est une pathologie neurodégénérative se caractérisant au niveau cérébral par deux lésions majeures : l'agrégation extracellulaire de peptides β-amyloïdes et l'agrégation intraneuronale de protéines Tau anormalement phosphorylées. Elle se caractérise au niveau symptomatique par un déclin cognitif menant progressivement à une perte d'autonomie du patient.

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. En effet, les traitements actuellement sur le marché sont dits symptomatiques et ont pour seul résultat un ralentissement du déclin cognitif. Il est de ce fait primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. D'une part, en raison de la complexité et de l'hétérogénéité de la pathologie, le développement de composés de type « *multi-target-directed ligand* » (MTDL) capables d'agir simultanément sur plusieurs cibles présentant un intérêt thérapeutique a émergé et offre des résultats prometteurs d'un point de vue symptomatique mais également « *disease-modifying* » dans des modèles précliniques murins. D'autre part, les études portant sur le microbiote intestinal ont permis de rappeler l'existence de l'axe microbiote-intestinal-cerveau et de démontrer que celui-ci est un acteur clé dans le bon fonctionnement cérébral et joue un rôle primordial dans le développement des pathologies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer dans un premier temps l'efficacité *in vivo* d'un nouveau composé multi-cible, la donécopirdine, qui est à la fois inhibitrice de l'acétylcholinestérase, agoniste du récepteur 5-HT_4 et antagoniste du récepteur 5-HT_6, sur la physiopathologie cérébrale mais également sur la dysbiose du microbiote intestinal du modèle murin 5XFAD. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact d'une modulation du microbiote intestinal du modèle 5XFAD sur la pathologie amyloïde par un traitement avec des antibiotiques ou l'administration d'un prébiotique, en présence ou non d'une altération du métabolisme. Enfin, par des techniques de transplantation de microbiote fécal, nous avons étudié l'impact du microbiote intestinal dysbiotique de souris 5XFAD sur la cognition lors de sa transplantation à des souris saines, et la possibilité de ralentir le développement des déficits cognitifs des souris 5XFAD en leur implantant un microbiote provenant de souris saines.

Bien que les connections entre le cerveau et l'intestin aient été identifiées par les premiers médecins grecs et Hippocrate, puis conceptualisées dans les années 1980 par la description des fonctions neuroendocrines, ce n'est que durant ces dix dernières années que le microbiote intestinal a été identifié comme un nouvel acteur des maladies du cerveau. L'intérêt pour les microorganismes qui colonisent nos intestins étant particulièrement récent dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, j'ai souhaité focaliser mon manuscrit de thèse sur le microbiote intestinal, tentant de résumer ici les concepts majeurs qui lui sont associés, dans la perspective que ce travail pourrait être utile aux étudiants travaillant sur les pathologies cérébrales.

La section introductive de ce manuscrit abordera donc dans un premier chapitre les connaissances actuelles générales sur le microbiote intestinal; se focalisera ensuite dans un second chapitre sur l'axe microbiote-intestinal-cerveau, détaillant les voies de communication associées et l'implication de cet axe dans l'homéostasie cérébrale ainsi que dans divers troubles neurologiques ; et présentera dans un troisième chapitre la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, décrivant les stratégies thérapeutiques dites centrales et la possibilité de développer des stratégies thérapeutiques périphériques innovantes en lien avec le microbiote intestinal. Après l'énoncé des objectifs généraux de l'étude, les résultats obtenus seront présentés en fonction de leur état d'avancement sous forme d'articles scientifiques publiés et en cours de rédaction ou sous format classique avec matériels et méthodes associés. Enfin, la dernière section de ce manuscrit sera consacrée à une discussion générale de l'ensemble de ce travail de thèse.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont conduit à la rédaction d'un article scientifique en cours de finalisation. Parallèlement, j'ai participé à l'écriture d'un chapitre de livre traitant de notre modèle de travail murin (Ismeurt et al., 2020). Cet article est présenté au début de de la section Résultats pour en faciliter la lecture. J'ai eu l'opportunité de présenter mes résultats de recherches *via* des communications orales ou des posters au cours de plusieurs symposiums (Annexe).

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

LE MICROBIOTE INTESTINAL, UN ORGANE A PART ENTIERE

I – Le microbiote intestinal, un organe à part entière

1. Généralités sur le microbiote

Le microbiote est défini par l'ensemble des micro-organismes qui colonisent un environnement donné, qu'il soit vivant (microbiote des animaux ou des végétaux) ou inerte (microbiote des aliments). Le microbiote comprend bactéries, virus, champignons, parasites et archées.

Le microbiote étant composé à 95% de bactéries, les notions abordées concernant le microbiote et les études réalisées dans cette thèse de doctorat sont basées sur le microbiote bactérien.

a. Un partenaire de longue date

La composition du microbiote étant spécifique à chaque individu, cela soulève la question de son origine. Durant des décennies, il était communément accepté que la colonisation bactérienne initiale se faisait à la naissance. Le Pr. T. Escherich avait décrit dans les années 80 que le méconium (premières selles du nouveau-né) était exempt de bactéries suggérant ainsi un développement fœtal dans un environnement stérile (Escherich, 1989). Plus tard, dans les années 90, d'autres chercheurs ont confirmé l'hypothèse de « l'utérus stérile » du fait de l'absence de bactéries dans le liquide amniotique et affirmant que les traces bactériennes retrouvées dans certains échantillons provenaient d'une infection (Harwick, Iuppa, and Fekety 1969; Stroup 1962). La colonisation du nouveau-né se ferait ainsi à la naissance et sa composition serait influencée par le mode d'accouchement. Lors d'un accouchement par voie basse, le microbiote du nouveau-né serait similaire au microbiote vaginal de la mère et lors d'un accouchement par césarienne il serait similaire au microbiote cutané de la mère (Dominguez-Bello et al., 2010) [Figure 1A].

Les études sur la stérilité de l'utérus et du méconium étaient principalement basées sur l'utilisation de cultures bactériennes. Cette théorie fut reconsidérée par des chercheurs pratiquant le séquençage de l'ADN (acide désoxyribonucléique) bactérien, montrant l'existence d'ADN bactérien dans le méconium, le placenta et le liquide amniotique (Aagaard et al., 2014; Collado et al., 2016; Jiménez et al., 2008). L'hypothèse d'une première colonisation « *in utero* » est alors apparue bien qu'aucune étude ne démontre la présence de bactéries viables dans l'environnement fœtal [Figure 1B].

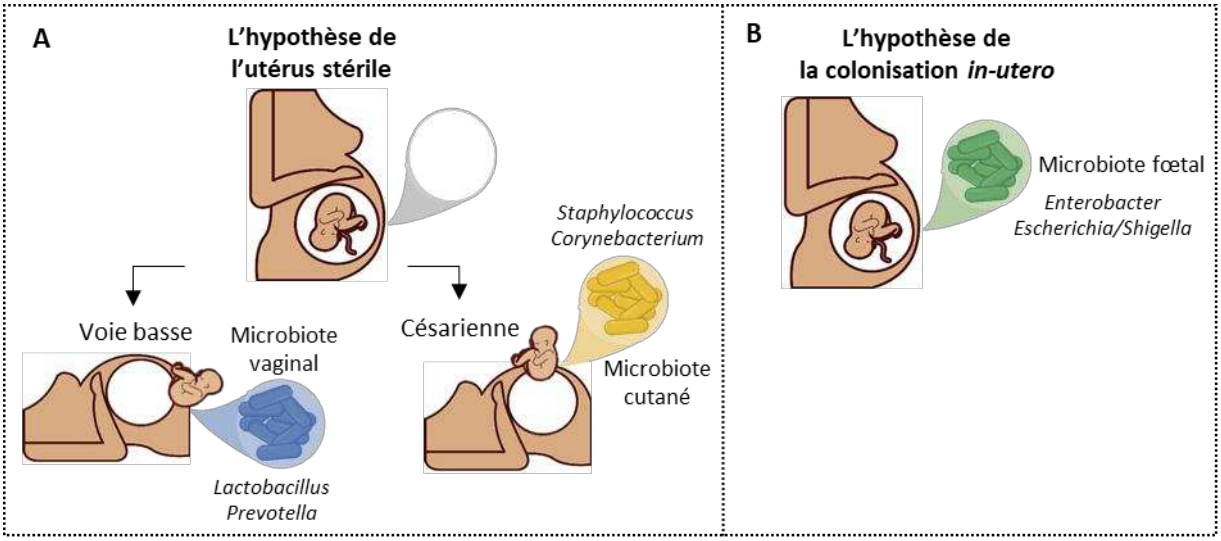


Figure 1 – Les hypothèses de la première colonisation bactérienne

Représentation schématique des deux hypothèses de la première colonisation bactérienne. (A) L'hypothèse de l'utérus stérile suggérant que le microbiote est acquis à la naissance et que sa composition dépend du mode d'accouchement. (B) L'hypothèse de la colonisation in utero suggère que le microbiote est acquis au cours du développement fœtal. En italique : principaux ADN bactériens (genres) identifiés dans le microbiote.

b. Les différents types de microbiote humain

Le microbiote d'un environnement donné peut être subdivisé selon le lieu de collecte. On distingue ainsi chez l'homme différents microbiotes : cutané, buccal, nasal, pulmonaire, oculaire, urogénital et intestinal.

Il est intéressant de noter que l'on retrouve la présence d'ADN bactérien dans le système sanguin (Païssé et al., 2016). De même, la présence d'ADN et/ou de bactéries dans le cerveau en condition physiologique fait l'objet de nombreuses interrogations (C. D. Link, 2021). En effet, une étude a montré la présence d'ADN bactérien dans le cerveau de patients séropositifs pour le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) mais également chez les sujets contrôles (Branton et al., 2013).

Parmi l'ensemble de ces microbiotes, le microbiote intestinal a démontré une implication particulièrement importante dans la santé humaine, et fût ainsi l'axe de recherche de cette thèse de doctorat.

2. Le microbiote intestinal

a. Un équilibre indispensable

Le mode d'accouchement, l'alimentation par lait maternel ou industriel et l'usage d'antibiotiques sont des facteurs majeurs qui induisent des modulations drastiques du microbiote intestinal du nourrisson, avec une augmentation de la diversité et de l'abondance bactérienne durant les premières années de vie (Aleman & Valenzano, 2019). Ce microbiote se stabilise vers l'âge de trois ans et devient proche de celui retrouvé à l'âge adulte où il est en état d'équilibre, appelé eubiose, contribuant ainsi à une bonne santé. Cette stabilité et cet équilibre peuvent néanmoins être altérés par le régime alimentaire, l'usage d'antibiotiques et le vieillissement. Lorsque cet équilibre est rompu, état alors appelé dysbiose, il est généralement associé à divers troubles sans que l'on sache s'il en est la cause ou la conséquence.

i. Troubles métaboliques

L'obésité et les troubles associés étant un problème de santé mondial majeur, cela a amené les chercheurs à développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Le Dr F. Backhed et ses collègues ont émis l'hypothèse que le microbiote intestinal pourrait être une cible intéressante en raison de son implication dans le métabolisme. Ils ont démontré que le microbiote est requis pour le stockage des graisses et pour le développement de l'obésité lors d'un régime alimentaire riche en graisse, et que des souris modèles d'obésité *Ob/Ob* C57BL/6J ainsi que des personnes obèses présentent une dysbiose intestinale avec un taux de bactéries appartenant au phylum Firmicutes plus élevé (Bäckhed et al., 2004, 2007; Ley et al., 2005, 2006). Par ailleurs, il est intéressant de noter que la composition du microbiote peut moduler les conséquences d'un régime riche en graisse. En effet, il a été démontré que le développement d'une hyperglycémie et d'une hyper-insulinémie suite à un tel régime dépend de la composition du microbiote intestinal (T. Le Roy et al., 2013).

Dans une autre étude pionnière, la colonisation de souris C57BL/6J axéniques – souris exempts de tous micro-organismes – par du microbiote humain provenant de personnes obèses, induit une augmentation de la charge graisseuse associée à des phénotypes métaboliques d'obésité, tandis que le microbiote provenant de personnes minces n'a pas d'effet néfaste (Ridaura et al., 2014). D'autres troubles en lien étroit avec l'obésité tel que

l'insulinorésistance ont également fait l'objet de nombreuses études. L'équipe du Pr. R. Burcelin a démontré qu'un régime riche en graisse induit une augmentation du taux de bactéries contenant du LPS (lipopolysaccharide) qui est responsable du développement d'une inflammation et d'une insulinorésistance. Les auteurs ont également démontré qu'un traitement permettant l'augmentation de bactéries de la classe des *Bifidobacterium* permet de normaliser cette insulinorésistance (Cani, Amar, et al., 2007; Cani, Neyrinck, et al., 2007).

ii. Troubles cérébraux

La caractérisation d'une dysbiose intestinale s'est ensuite étendue à d'autres pathologies, notamment en lien avec la santé mentale. Il a été démontré qu'une dysbiose microbienne est associée à des troubles psychiatriques tels que la dépression et la schizophrénie, et à des troubles neurologiques tels que la sclérose en plaque ou encore la maladie d'Alzheimer qui seront détaillés plus en détails dans un prochain chapitre (Cheung et al., 2019; Grochowska et al., 2019).

b. De la caractérisation du microbiote intestinal à son analyse

Une dysbiose du microbiote intestinal étant associée à diverses pathologies, il est important de caractériser les populations bactériennes intestinales ainsi que les métabolites produits par ces bactéries par des approches de métagénomique et de métabolomique.

i. La métagénomique

Durant des décennies, seule une faible partie du microbiote intestinal était connue. En effet, la détection et la caractérisation des bactéries le composant reposaient sur des techniques classiques de culture aérobie. Or, il est estimé que 99% des bactéries sont non-cultivables, et parmi les bactéries cultivables, 70% sont anaérobiques (Ferrer, Martínez-Abarca, et al., 2005). Le développement des cultures anaérobies (Hungate, 1979) et l'arrivée de nouvelles techniques de biologie moléculaire telle que la métagénomique ont ainsi permis de découvrir une grande diversité microbienne intestinale jusqu'alors sous-estimée.

La métagénomique repose sur le séquençage de l'ensemble des gènes du microbiote, aussi appelé microbiome, et peut être divisée en deux stratégies : la métagénomique ciblée et la métagénomique globale.

La métagénomique bactérienne ciblée

La métagénomique bactérienne ciblée permet l'identification des taxons bactériens qui sont classifiés selon six rangs taxonomiques correspondant à différents niveaux hiérarchiques, l'espèce étant le plus petit rang existant et dans lequel le degré de ressemblance entre individu est le plus élevé [Figure 2A]. Cette technique repose sur le séquençage du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN (acide ribonucléique) ribosomal bactérien (Woese et al., 1990; Zoetendal et al., 1998). Ce gène contient des régions identiques présentes dans toutes les bactéries, appelées régions conservées, utilisées comme sites de complémentarité afin d'effectuer une amplification du gène ; et neuf régions spécifiques à chaque espèce bactérienne, appelées régions hypervariables, déterminant la signature bactérienne. Usuellement, deux à trois régions hypervariables sont ciblées telles que V1-V3 ou V3-V4 car cela est considéré comme suffisant pour pouvoir différencier les espèces bactériennes entre-elles [Figure 2B]. Cependant dans une étude récente, le Dr. Johnson et ses collègues démontrent l'intérêt de séquencer le gène de l'ARN 16S dans son intégralité (Johnson et al., 2019). Certaines régions montrent un biais dans l'identification des bactéries selon le niveau taxonomique. On peut citer les régions V3-V5 qui ne permettent pas une classification précise des bactéries appartenant au phylum Actinobacteria. Le séquençage complet de l'ARN 16S permettrait ainsi de contourner les problèmes d'affiliations multiples et le taux de mauvaises affiliations pouvant masquer une grande partie de la diversité bactérienne. Une analyse informatique par comparaison des séquences obtenues avec une base de données permet ensuite d'identifier les bactéries présentes et leur classification taxonomique.

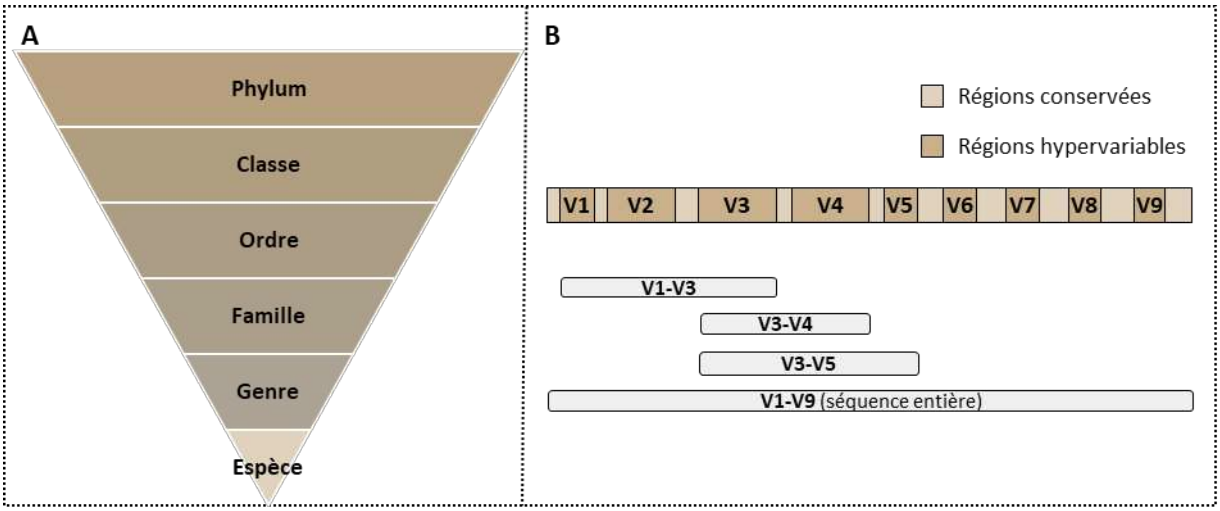


Figure 2 – Les niveaux taxonomiques et le gène de l'ARN 16s bactérien

Représentation schématique des différents niveaux taxonomiques (A) et du gène de l'ARN 16s bactérien et des principales régions séquencées pour l'identification bactérienne (B).

La métagénomique globale

La métagénomique globale se base sur le séquençage de l'ensemble des gènes présents dans l'échantillon et permet ainsi une caractérisation fonctionnelle. En 2008, un projet collaboratif avec l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement) et financé par la Commission Européenne, appelé MetaHIT (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) (Qin et al., 2010), avait pour objectif d'établir un catalogue de l'ensemble des gènes retrouvés dans le microbiote intestinal humain. Ce projet a permis d'identifier et de référencer environ 3,3 millions de gènes dont plus de 99 % appartiennent au groupe phylogénétique des Bactéries ou Archées. Cette étude a également permis de définir et décrire un « génome intestinal minimal » correspondant à des gènes présents dans chaque bactérie permettant leur survie, et un « métagénome intestinal minimal » correspondant à un ensemble de gènes bactériens présents chez chaque individu permettant une bonne homéostasie de l'environnement intestinal. La même année, un projet similaire appelé HMP (*Human Microbiota Project*) et organisé par le NIH (*National Institutes of Health*) avait pour objectif d'identifier l'ensemble des micro-organismes humains et caractériser les différences selon le lieu de collecte sur le corps (Huttenhower et al., 2012). Cette étude a mis en évidence que le microbiote intestinal forme un cluster se différenciant nettement des microbiotes oral, nasal, cutané et génital.

ii. La métabolomique

L'apparition d'autres techniques telle que la métabolomique a permis d'étendre la caractérisation du microbiote intestinal au-delà de la génomique en identifiant les métabolites issus du métabolisme intestinal. Les techniques de détection de ces derniers reposent sur la chromatographie et la spectrométrie de masse ou la RMN (résonance magnétique nucléaire) (Dormoy & Massfelder, 2013). Les analyses effectuées dans cette thèse de doctorat ont été réalisées avec par HPLC (*high-performance liquid chromatography*) en colonne C18 et HILIC (*hydrophilic interaction chromatography*), permettant de séparer respectivement les métabolites non-polaires et polaires, suivi d'une analyse en spectrométrie de masse. Cette dernière consiste en la séparation des métabolites extraits par HPLC en fonction de leur masse et de leur charge, suivi de leur identification et quantification (Menet, 2011).

De la même manière que MetaHIT et HMP, le HMDB (*Human Metabolome Database*) est la plus grande base de données existante depuis 2007 regroupant une centaine de milliers de

métabolites humains (Wishart et al., 2018) précisant également leur rôle biologique, leur concentration physiologique, les voies métaboliques et les pathologies qui y sont associés.

iii. L'analyse des données de métagénomique ciblée bactérienne

Les données obtenues après caractérisation de la composition du microbiote bactérien par métagénomique ciblée peuvent être analysées de différentes façons, fournissant ainsi de nombreuses informations en termes de richesse, diversité et composition bactérienne.
La première étape est la constitution de la table des unités taxonomiques opérationnelles ou OTU (*operational taxonomic unit*) correspondant aux plus petites unités regroupant des taxons ayant au moins 97% de similitudes au niveau du gène de l'ARN 16S. Cette table comporte pour chaque échantillon et pour chaque OTU le nombre de séquences retrouvées [Figure 3A]. Viennent ensuite les analyses de diversité et les assignations taxonomiques.

L'alpha diversité

Elle mesure la richesse et/ou la diversité taxonomique d'un échantillon donné. Cette analyse donne une valeur par échantillon et peut être calculée par différents indices mathématiques qui se basent sur la richesse (nombre d'OTU) et/ou sur l'uniformité (abondance des individus composant chaque OTU) de l'échantillon :

- Observed et Chao1 : uniquement la richesse
- Shannon et Simpson : richesse et uniformité (l'indice de Shannon étant plus sensible à l'uniformité, et l'indice de Simpson à la richesse)

Pour chaque indice, plus la valeur de l'alpha diversité sera élevée et plus l'échantillon sera considéré diversifié [Figure 3B].

La bêta diversité

Elle mesure la dissimilarité entre échantillons via différentes méthodes : Jaccard, Bray-Curtis, Unifrac, Weighted Unifrac. Elles sont basées sur la comparaison de l'abondance et/ou de la distance phylogénétique de chaque OTU pour chaque échantillon. Lorsque les échantillons sont composés de plusieurs OTU, il est impossible de représenter la comparaison selon deux axes. Pour cela, deux composantes principales sont définies : ce sont les deux variables les plus pertinentes afin de différencier la β-diversité entre chaque échantillon. Les méthodes de Bray-Curtis et Weighted Unifrac prennent en compte l'abondance, et les méthodes d'UniFrac et Weighted Unifrac la distance phylogénétique [Figure 3C].

L’abondance relative

Elle permet d’estimer la proportion de chaque OTU à un niveau taxonomique donné par rapport au nombre total d’OTU présentes [Figure 3D]. A noter que lors de la caractérisation bactérienne des rangs les plus bas (genre, espèce) le taux de bactéries non-affiliées augmente.

Le LEfSe

Le LEfSE (*Linear discriminant analysis effect size*) correspond à un algorithme statistique permettant d’identifier les différences significatives à tous les niveaux taxonomiques entre deux échantillons ou plus. Ces résultats sont généralement représentés sous forme de cladogramme. Une différence statistique significative à chaque niveau de l'arbre témoigne d'une modulation de la composition bactérienne particulièrement robuste [Figure 3E].

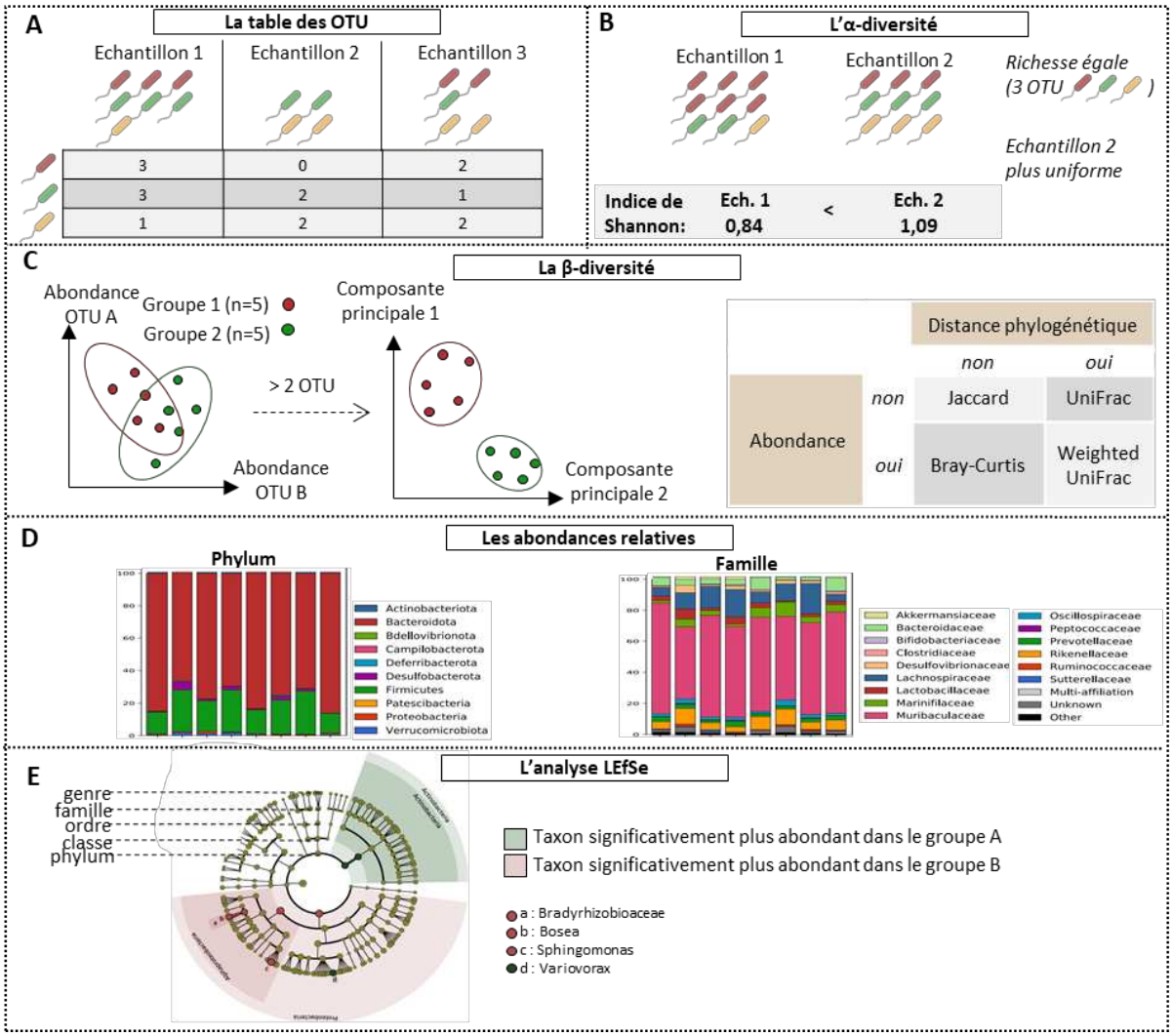


Figure 3 – Les analyses de métagénomiques ciblées

Représentation schématique de la table des OTU (A), l’α- et β-diversité (B-C), l’abondance relative dans huit groupes expérimentaux (D), et l’analyse LEfSe de deux groupes expérimentaux (E), adapté de Lelouvier et al., 2016.

c. Une vaste communauté

La caractérisation du microbiote intestinal a permis de découvrir l'étendue de sa diversité. Il est estimé que chaque individu possède en moyenne 160 genres bactériens différents (Qin et al., 2010) avec un total de plus de cent mille milliards de bactéries intestinales. Parmi les phyla bactériens, les Firmicutes et Bacteroidetes représentent 90% du microbiote intestinal, les Firmicutes étant les plus abondants (Hold et al., 2002; Qin et al., 2010; X. Wang et al., 2003). Viennent ensuite les phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia et Fusobacteria (Eckburg et al., 2005). Le phylum Firmicutes est composé à 95% de bactéries du genre *Clostridium*, mais également *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Ruminococcus*. Le phylum Bacteroidetes est principalement constitué de bactéries du genre *Bacteroides* et *Prevotella* (Rinninella et al., 2019) [Figure 4A]. Par ailleurs, la proportion de trois genres bactériens prédominants a permis de classer la population selon trois groupes appelés entérotypes : *Bacteroidetes*, *Prevotella* et *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011) [Figure 4B].

Néanmoins, malgré une abondance des phyla et genres plus ou moins conservée entre individus, il existe une grande hétérogénéité au niveau de la proportion des espèces bactériennes. De plus, la composition bactérienne varie le long du tractus gastro-intestinal (O'Hara & Shanahan, 2006) [Figure 4C] : il y a une abondance croissante de bactéries du duodénum jusqu'au côlon du fait de l'augmentation du pH tandis que le ratio de bactéries aérobies/anaérobies diminue du fait de la diminution de la concentration en oxygène (G. He et al., 1999; Ilhan et al., 2017). La composition bactérienne varie également selon un axe transversal (O'Hara & Shanahan, 2006; Pryde et al., 1999; Zoetendal et al., 2002) : la proportion de bactéries aérobies est plus élevée au niveau de la muqueuse intestinale où l'environnement est enrichi en oxygène que dans la lumière intestinale (Albenberg et al., 2014).

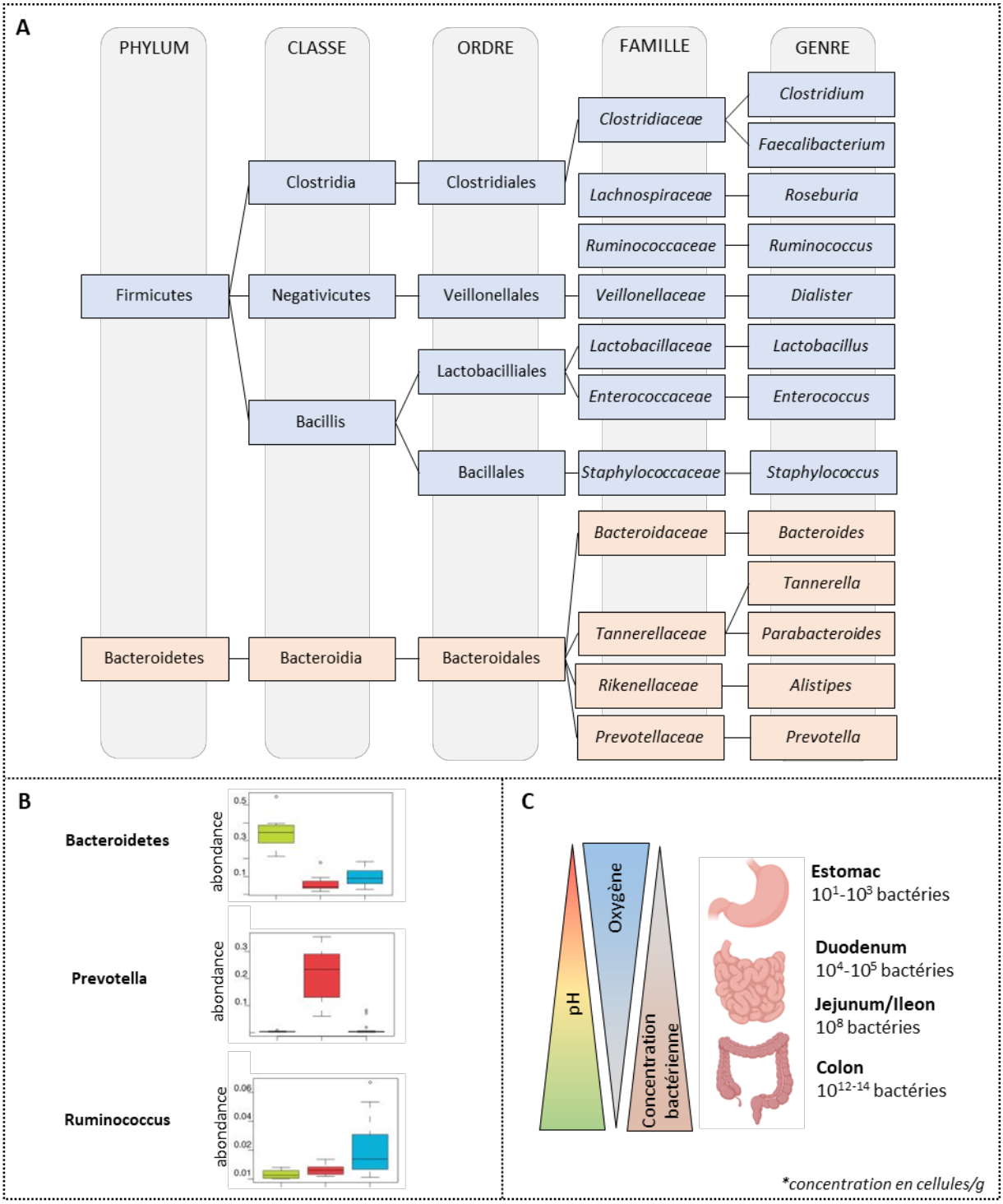


Figure 4 – Une vaste communauté

Représentation schématique de la diversité du microbiote intestinal retrouvée dans les deux phyla principaux, adapté de Rinninella et al. 2019(A) ; des trois entérotypes existants dans la population, adapté de Arumugam et al., 2011 (B), et de l'abondance bactérienne hétérogène le long du tractus gastrointestinal (C).

d. Un allié vital

Le microbiote intestinal, bien que sa composition soit propre à chaque individu, exerce des effets physiologiques bénéfiques pour la santé humaine. On parle de relation symbiotique : l'environnement intestinal fournit une niche pour le développement bactérien et le microbiote fournit diverses fonctions bénéfiques pour son hôte.

i. Protection

La barrière intestinale permet l'absorption des nutriments provenant de l'alimentation et la protection de l'organisme envers le contenu de la lumière intestinale (Groschwitz & Hogan, 2009; Podolsky, 1999). Elle peut être divisée en trois sous-barrières que le microbiote intestinal est en capacité de moduler.

Barrière microbienne et chimique

Les bactéries intestinales endogènes; dites commensales, peuvent entrer en compétition avec les bactéries exogènes pathogènes ou endogènes opportunistes en occupant les sites d'adhérence au niveau de l'épithélium intestinal et en diminuant l'accès aux nutriments limitant ainsi leur croissance (Pereira & Berry, 2017). Elles participent également au développement de la couche de mucus produit par les cellules caliciformes : des souris axéniques possèdent une couche plus fine pénétrable par les micro-organismes. Ce phénotype est normalisé suite à une colonisation avec du microbiote provenant de souris conventionnelles (Johansson et al., 2015). De même, les bactéries commensales régulent la proportion des cellules de Paneth et des cellules Tuft, ayant respectivement un rôle dans la sécrétion de PAM (peptide anti-microbien) et dans la réponse immunitaire (McKinley et al., 2017; Schoenborn et al., 2019) [Figure 5].

Barrière physique

Le microbiote intestinal permet de maintenir l'intégrité et la perméabilité de la barrière intestinale : une dysbiose intestinale diminue l'expression des protéines telles que l'occludine et la claudine appartenant à la famille des protéines des jonctions serrées (Feng et al., 2019), et affecte la prolifération cellulaire nécessaire au renouvellement de l'épithélium intestinal (Alam & Neish, 2018) [Figure 5].

Barrière immunologique

Nous avons vu précédemment que le microbiote intestinal permet de moduler la proportion et la fonction des cellules de Paneth et des cellules Tuft. Il module également la réponse inflammatoire en agissant sur le développement et le maintien du système immunitaire intestinal présent au niveau des plaques de Peyers (Belkaid & Hand, 2014) [Figure 5].

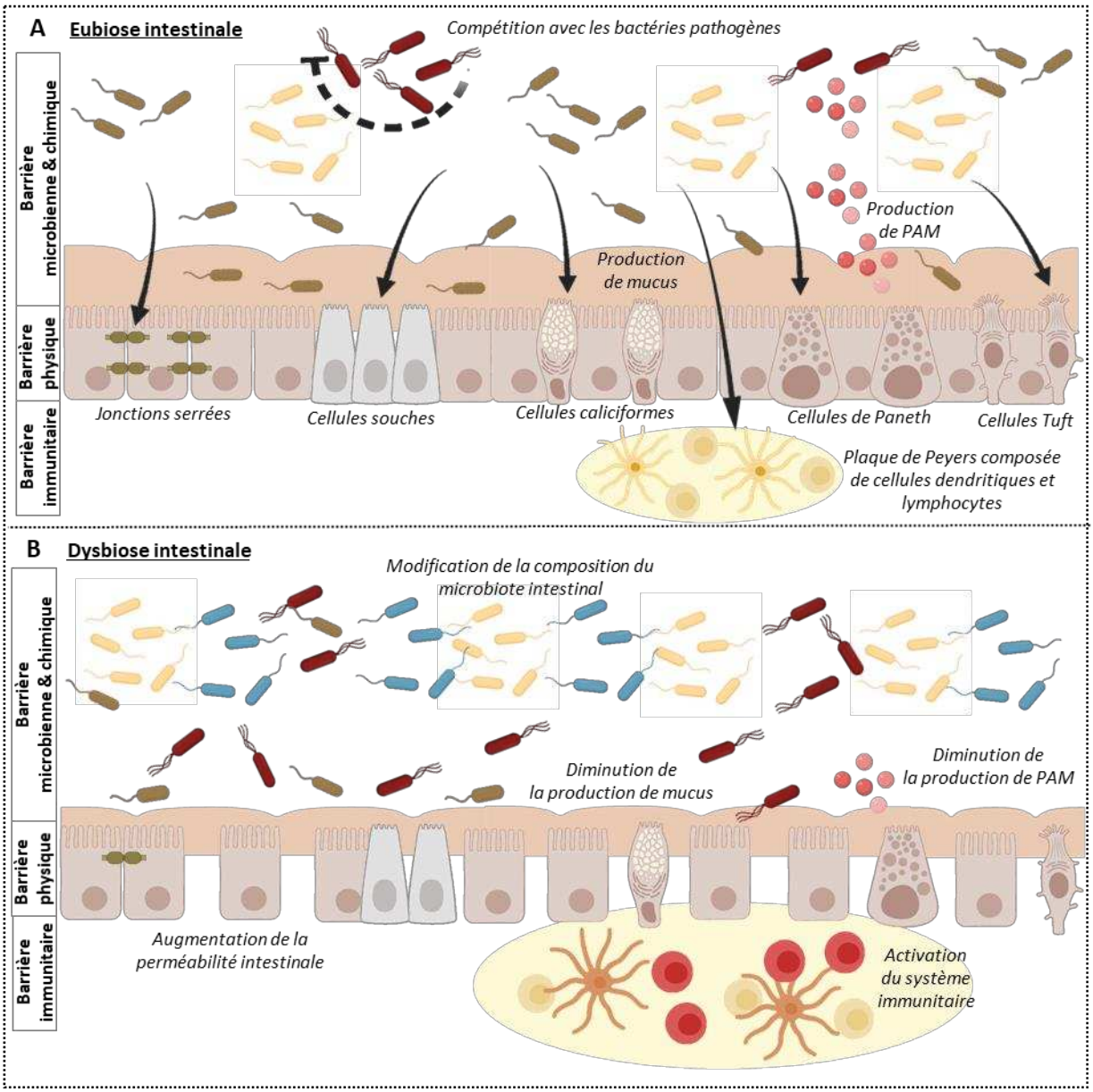


Figure 5 – Le microbiote et la barrière intestinale

Représentation schématique d'une eubiose intestinale où le microbiote permet de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal via l'expression des protéines des jonctions serrées, d'entrer en compétition avec les bactéries pathogènes, de stimuler la production de mucus et de peptides anti-microbiens (PAM) et de moduler le système immunitaire (A) ; et les conséquences d'une dysbiose intestinale menant à une augmentation de la perméabilité intestinale, une diminution de la couche de mucus, une diminution de la production de PAM et une augmentation de la réponse immunitaire (B).

ii. Immunité

La découverte de l'implication du microbiote intestinal dans le développement et la maturation du système immunitaire intestinal provient en grande majorité d'études comparatives entre souris conventionnelles et souris axéniques. Ces dernières présentent diverses altérations (Round & Mazmanian, 2009) : une altération tissulaire avec une diminution de la taille des plaques de Peyer, des centres germinatifs et des follicules lymphoïdes ; une altération cellulaire avec une diminution du nombre de lymphocytes ; et une altération moléculaire avec une diminution de l'expression des récepteurs immunitaires ou de la sécrétion d'anticorps. Le microbiote intestinal module également les réponses immunitaires (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010). De nombreuses études portant sur l'usage d'antibiotiques supportent cette fonction immunitaire (Ubeda & Pamer, 2012) : un traitement antibiotique chez des souris conventionnelles est en capacité de moduler la composition du microbiote intestinal et induit une altération du nombre de lymphocytes et d'anticorps. Par ailleurs, une étude portée sur les SFB (*Segmented filamentous bacteria*), présentes uniquement chez les enfants en bas âge, démontre une corrélation positive entre leur concentration et le taux d'IgA (Immunoglobuline de type A) sécrétées dans la lumière intestinale suggérant un rôle des SFB dans le développement du système immunitaire (B. Chen et al., 2018).

iii. Métabolisme

Le microbiote intestinal possède un rôle majeur dans la digestion et le métabolisme des nutriments (Rowland et al., 2018). Il est responsable de la fermentation des glucides et acides gras non-digérés par les enzymes humaines et des protéines entraînant la libération de nombreux métabolites qui seront détaillés dans un prochain chapitre tels que des AGCC (acides gras à chaîne courte), des acides biliaires secondaires, des polyamines et des dérivés du tryptophane. Il est également capable de synthétiser des vitamines essentielles telles que les vitamines du groupe B et K. L'ensemble de ces métabolites a des effets bénéfiques pour l'hôte en agissant sur le système immunitaire et le système nerveux intestinal, et sur l'ensemble de l'organisme en passant par la circulation sanguine. Par exemple, les AGCC fournissent la principale source d'énergie pour les cellules épithéliales, ils correspondent à 10% des apports caloriques journaliers requis chez l'Homme, ils modulent le système

immunitaire et peuvent contrôler la prise alimentaire via la modulation de la production d'hormones par les cellules endocrines (Den Besten et al., 2013) [Figure 6].

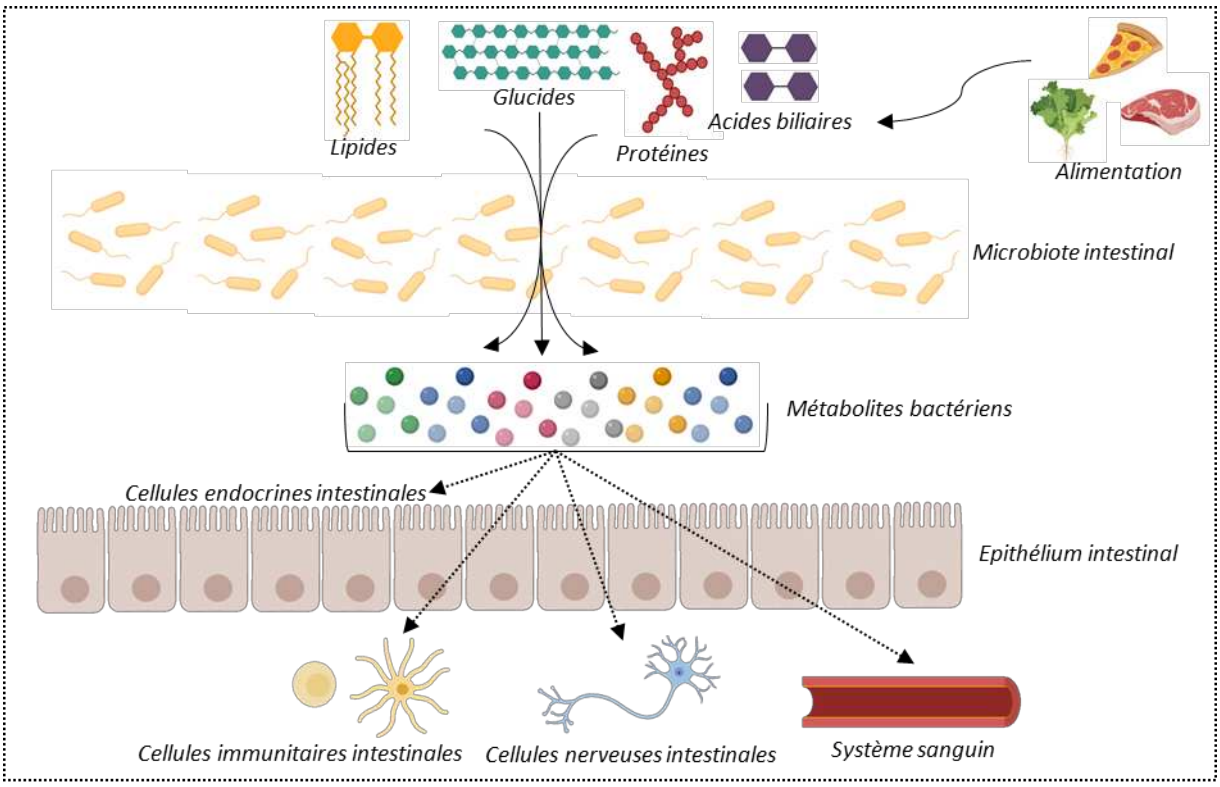


Figure 6 – Le métabolisme bactérien

Représentation schématique du métabolisme des nutriments par le microbiote intestinal permettant la production de métabolites bactériens pouvant agir sur les cellules épithéliales, le système immunitaire, le système nerveux ou passer dans la circulation sanguine pour agir sur l'ensemble de l'organisme.

e. Une évolution constante

Le microbiote jouant un rôle vital pour l'hôte il est important de connaître quels facteurs participent à sa composition et quelles méthodes peuvent être employées afin de le moduler en cas de troubles associés à une dysbiose intestinale (Hasan & Yang, 2019).

i. Facteurs affectant le microbiote intestinal

Une dynamique importante et rapide du microbiote intestinal a lieu durant les trois premières années de vie puis se stabilise. La gestation, la voie d'accouchement et les années qui suivent ont donc une importance majeure afin d'avoir un « core » bactérien optimal pour une bonne santé. D'autres facteurs tels que l'alimentation et l'usage d'antibiotique ainsi que des facteurs internes à l'hôte peuvent également influencer la composition microbienne [Figure 8].

Facteurs externes

Voie d'accouchement et alimentation du nourrisson

La colonisation initiale provenant majoritairement de la mère, le microbiote intestinal évolue ensuite de manière importante au cours des premières années de vie jusqu'à l'âge de trois ans (Yatsunenko et al., 2012). Le mode d'accouchement est l'un des facteurs majeurs de la composition microbienne initiale : un accouchement par voie basse induit une présence majoritaire de bactéries du genre *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Prevotella* ; tandis qu'un accouchement par césarienne favorise des bactéries du genre *Streptococcus* et *Staphylococcus* (Dominguez-Bello et al., 2010; Rutayisire et al., 2016). L'alimentation du nouveau-né influence également la composition bactérienne : le lait maternel contient des IgA sécrétées et des oligosaccharides qui favorisent le maintien de bactéries du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* tandis qu'un lait industriel favorise le développement de bactéries du genre *Enteroccocus* ou *Streptoccocus* (Marcobal et al., 2010; Rogier et al., 2014).

Alimentation

L'alimentation et les nutriments qui y sont associés ont une influence directe et indirecte sur la composition du microbiote intestinal, notamment sur le ratio Firmicutes/Bacteroidetes (Sutoyo et al., 2020). Une augmentation de ce dernier est observé chez les personnes obèses et dans des modèles murins d'obésité (Turnbaugh et al., 2006), et peut être modulé à un niveau comparable à des personnes saines suite à une perte de poids (Ley et al., 2006).

Le régime occidental, caractérisé par une consommation excessive d'aliments transformés, fait l'objet d'une attention particulière en raison de son association avec le développement de maladies métaboliques. Ces aliments comprennent de nombreux additifs alimentaires tels que les émulsifiants qui ont un impact crucial sur le microbiote intestinal et le développement d'une inflammation intestinale (Chassaing et al., 2015; Naimi et al., 2021; Zinöcker & Lindseth, 2018) [Figure 7]. A l'inverse, le régime méditerranéen, principalement composé de fruits, légumes et céréales, montre de nombreux bienfaits sur la santé de personnes âgées ou de personnes obèses (Ghosh et al., 2020; Meslier et al., 2020). Les boissons consommées et leur pH ont également une influence : il a été démontré qu'une consommation de vin rouge augmente la diversité bactérienne (C. I. Le Roy et al., 2020) et une eau acidifiée induit un changement de composition bactérienne par opposition à une consommation d'eau alcaline (T. H. Hansen et al., 2018; Sofi et al., 2014; Wolf et al., 2014).

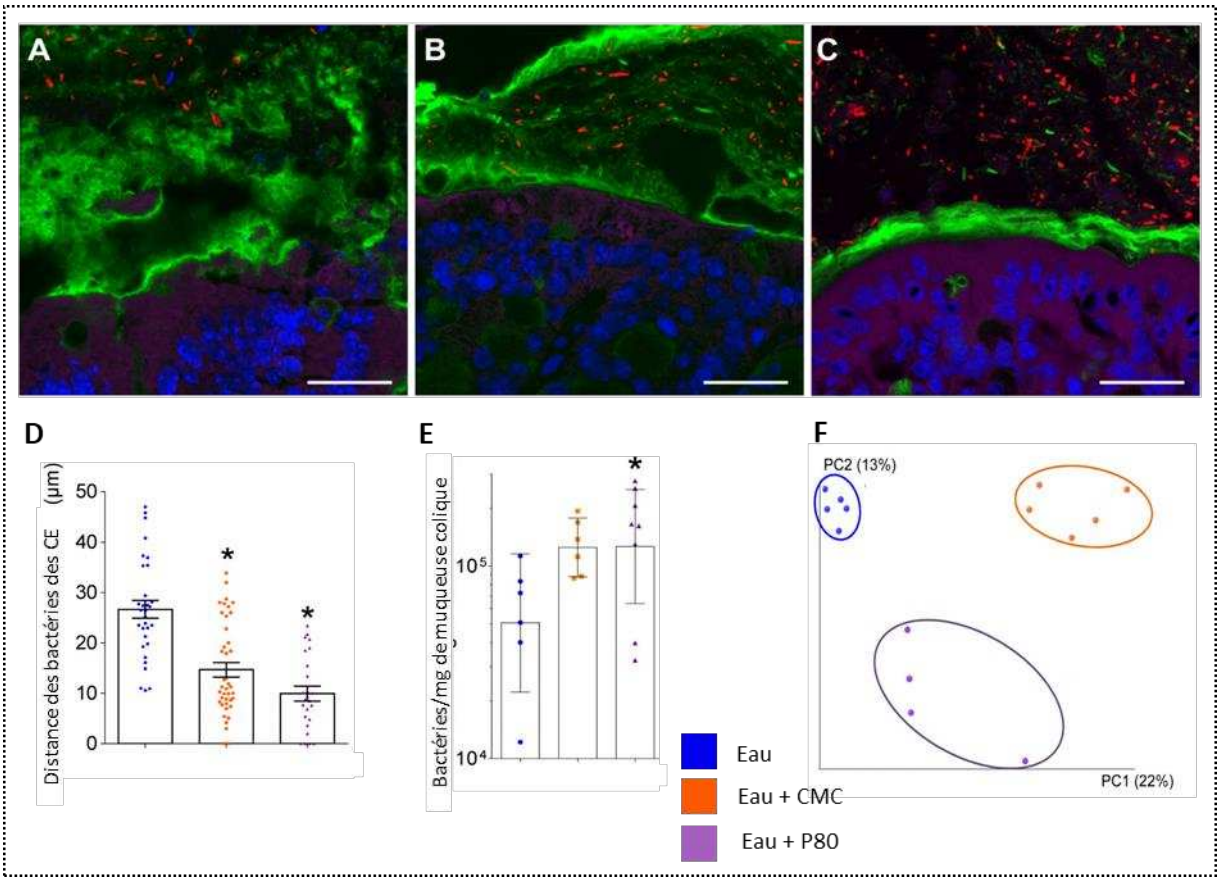


Figure 7 - Impact des émulsifiants alimentaires sur le microbiote intestinal

Les émulsifiants alimentaires modifient la localisation du microbiote intestinal et sa composition. Des souris saines ont été exposées à de l'eau potable (A) seule, contenant du CMC (B) ou du P80 (C) (1,0 %) pendant 12 semaines. Analyse en microscopie confocale de la localisation microbienne : MUC2 (en vert), actine (en violet), bactéries (en rouge) et ADN (en bleu). Barre d'échelle : 20 mm. Distance des bactéries les plus proches des cellules épithéliales l'intestin (CE) (D). Quantification par PCR de la charge bactérienne adhérente à la muqueuse colique (E) ß-diversité : Analyse en composantes principales (UniFrac) de la composition bactérienne des souris (F). D'après B et al. 2015. CMC : Sodium carboxymethylcellulose. P80 : polysorbate-80.

L'âge

Le microbiote intestinal va également évoluer de manière naturelle et continuelle de la même manière que l'ensemble des cellules qui composent l'organisme. Avec l'âge, il y a une diminution de la diversité bactérienne qui est observée ainsi qu'un changement de composition. Le microbiote de jeunes personnes est enrichi en bactéries bénéfiques pour la santé telles que les bactéries du genre *Bifidobacterium, Lactobacillus* et *Bacteroides* tandis que le microbiote de personnes âgées est enrichi en bactéries opportunistes telles que les espèces *Clostridium difficile* et *Clostridium perfrigens* (Aleman & Valenzano, 2019; Nagpal et al., 2018). Citons aussi *Helicobacter pylori* qui est retrouvé dans plus de 40% des personnes âgées et est associée à un risque d'ulcère gastro-duodénal(Pilotto & Franceschi, 2014) mais également de maladie neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Álvarez-Arellano & Maldonado-Bernal, 2014).

Usage d'antibiotique

Les antibiotiques sont connus pour induire un changement rapide de la richesse et de l'abondance bactérienne intestinale mais ils impactent également la résilience du microbiote, c'est-à-dire sa capacité à revenir à son état initial et à rester stable. Des études ont démontré que lors de l'arrêt d'un traitement antibiotique il y a une résilience au niveau de la proportion des phyla bactériens mais que la diversité bactérienne reste amoindrie et peut persister durant des années (Jakobsson et al., 2010; Jernberg et al., 2007; Manichanh et al., 2010). En raison de leurs effets à large spectre, les antibiotiques vont éliminer des bactéries pathogènes et bénéfiques ce qui peut induire une augmentation de bactéries ou champignons opportunistes, et favoriser le développement de bactéries multi-résistantes (K. Brown et al., 2015; Gutierrez et al., 2020). Par ailleurs, leur utilisation durant la grossesse influence le microbiote du nouveau-né (Mueller et al., 2015; Tekieli et al., 2016).

Facteurs internes

Génétiques

Les miARN (micro ARN), correspondant à des ARN non-codants, sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes. Après leur synthèse dans le noyau, ils sont exportés dans le cytoplasme où ils sont maturés par la protéine dicer puis intégrés dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ce dernier se fixe sur les parties 3'UTR (*untranslated regions*) des ARNm (ARN messagers) provoquant une inhibition de la traduction

et une dégradation de ces derniers. Longtemps considérés uniquement intracellulaires, le Dr. S. Gilad et ses collègues démontrèrent en 2008 la présence de miARN dans le milieu extracellulaire (Gilad et al., 2008) : dans la salive, les urines, le lait maternel, les fèces et le contenu intestinal (A. Link et al., 2010; S. Liu et al., 2016; Weber et al., 2010).

Au niveau intestinal, la concentration en miARN varie le long du tractus gastro-intestinal : il y a une abondance décroissante de miARN de l'iléon jusqu'au côlon, inversement à la concentration de bactéries. Ils sont libérés dans le milieu extracellulaire par des exosomes de cellules épithéliales, intégrés dans les cellules bactériennes où ils vont se fixer sur les ARNm bactériens, inhiber l'expression des gènes et ainsi affecter la croissance bactérienne. Leur implication dans la composition bactérienne est supportée par la présence d'une dysbiose intestinale dans un modèle de souris transgénique n'exprimant pas la protéine dicer dans les cellules épithéliales intestinales, et n'ayant donc aucun miARN mature dans le contenu intestinal (S. Liu et al., 2016).

Protéiques

Le mucus produit par les cellules caliciformes est principalement composé de mucines, protéines appartenant à la famille des O-glycoprotéines, dont les résidus O-glycanés sont un site d'adhésion et une source nutritive bactérienne. Ainsi, le mucus est majoritairement colonisé par des bactéries exprimant des enzymes capables de métaboliser ces oligosaccharides complexes (Formosa-Dague et al., 2018; Ringot-Destrez et al., 2018; Tailford et al., 2015).

Les IgA sécrétées par les cellules immunitaires intestinales, après avoir atteint la lumière intestinale par transcytose au travers des cellules épithéliales, se lient à de multiples bactéries du fait de leur poly-réactivité pour les composants bactériens (Bunker & Bendelac, 2018). Ces complexes IgA-bactéries ont de multiples effets affectant la composition bactérienne intestinale : formation de biofilms bactériens les protégeant du système immunitaire et des antibiotiques, élimination par le système immunitaire après transcytose inverse au travers des cellules M ou encore modulation de l'expression des gènes bactériens (Bunker & Bendelac, 2018; Peterson et al., 2007; Randal Bollinger et al., 2003; R. Roy et al., 2018).

Les cellules de Paneth sécrètent des PAM après activation de leur récepteur PRR (*pattern recognition receptor*) par des composants bactériens. Les principaux PAM sont des lysozymes,

la phospholipase A2, l'α-défensine, la lectine RegIIIγ (*regenerating islet-derived protein 3 gamma*) ou encore des ribonucléases (Elphick & Mahida, 2005; Ganz, 2003).

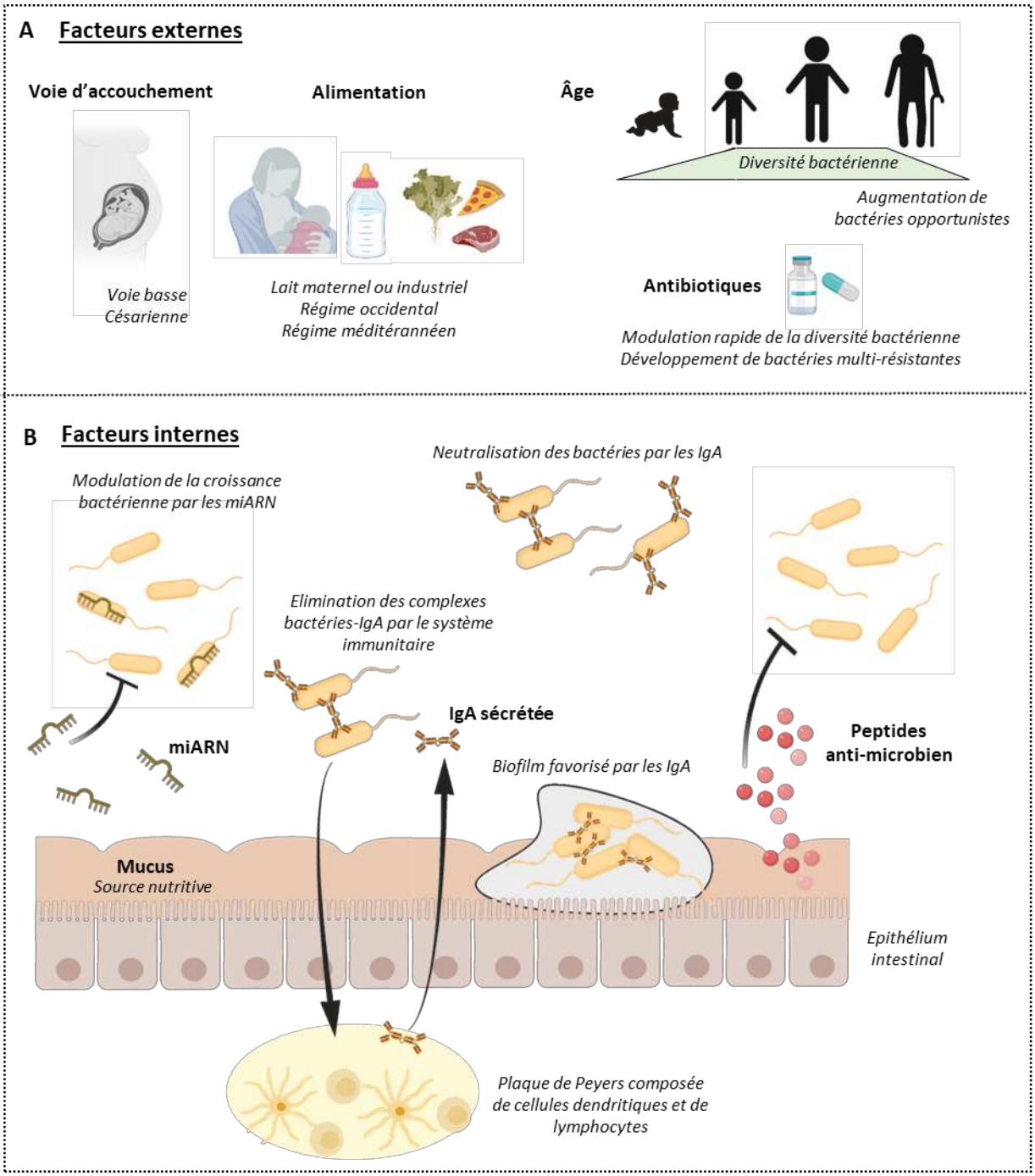


Figure 8 – Les facteurs affectant le microbiote intestinal

Représentation schématique des facteurs externes (A) et internes (B) affectant la composition du microbiote intestinal. Les facteurs internes peuvent inhiber (miRNA et peptides anti-microbiens) ou stimuler (mucus comme source nutritive) la croissance bactérienne et peuvent protéger (formation de biofilm) ou éliminer (système immunitaire et neutralisation) les bactéries via les IgA sécrétées.

ii. Modulation du microbiote intestinal

Une dysbiose du microbiote pouvant causer ou participer au développement de divers troubles, des stratégies ont été développées afin de restaurer un équilibre bactérien [Figure 9].

Prébiotiques

Les prébiotiques sont des composés inertes, sources d'énergies pour les bactéries [Figure 9A] qui doivent remplir de multiples critères : résister à l'acidité gastrique, ne pas être métabolisés par les enzymes digestives de l'hôte, être métabolisés par le microbiote intestinal et stimuler sélectivement l'activité et/ou la croissance de bactéries associées à un effet bénéfique pour l'hôte. Ces traitements engendrent ainsi une modification de la composition du microbiote en promouvant la présence de bactéries ayant la machinerie enzymatique nécessaire pour les métaboliser, correspondant généralement aux bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Slavin, 2013; S. Wang et al., 2020). Les principaux prébiotiques utilisés sont les fibres végétales en raison de l'augmentation du taux d'AGCC et de la diminution du pH de l'environnement intestinal suite à leur fermentation. De nombreuses études ont analysé les effets bénéfiques de ces traitements, notamment dans le cas des troubles métaboliques tels que l'obésité et le diabète : un traitement à base d'oligofructose chez des souris transgéniques modèles d'obésité, *Ob/Ob*, engendre une augmentation du taux de *Bifidobacterium* et corrige l'endotoxémie métabolique présente dans ce modèle (Cani, Possemiers, et al., 2009).

Probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui présentent un effet bénéfique pour la santé [Figure 9B]. Usuellement, ils correspondent à des cocktails de bactéries du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, bien que des levures peuvent également être utilisées (Dinleyici et al., 2012). Ils sont dosés de manière à ce qu'une quantité suffisante puisse passer au travers de l'environnement acide de l'estomac et doivent être pris quotidiennement pour que leurs effets soient maintenus. Dans l'environnement intestinal, ces probiotiques vont avoir un effet bénéfique *via* différents mécanismes (Bermudez-Brito et al., 2012) : compétition pour les sites d'adhésion, production de PAM tels que la reutérine (Talarico et al., 1988), modification du pH intestinal en produisant des substances telles que l'acide lactique ou acétique qui rendent l'environnement défavorable à la croissance bactérienne, stimulation du

système immunitaire ou encore maintien de l'intégrité de la barrière intestinale par stimulation des gènes codant pour les jonctions serrés et stimulation de la sécrétion de mucine.

Symbiotiques

Les symbiotiques allient les probiotiques et prébiotiques. Ils peuvent être sélectionnés de façon indépendante pour leur effet bénéfique, ou de manière à ce que le prébiotique soit bénéfique au probiotique associé (Pandey et al., 2015).

Antibiotiques

Les antibiotiques correspondent à des composés ayant un pouvoir bactéricide ou bactériostatique [Figure 9C]. Leurs mécanismes d'action sont multiples : inhibition de la synthèse protéique, inhibition de la synthèse d'acides nucléiques, inhibition de la synthèse de la membrane cellulaire ou inhibition du métabolisme des folates (Kapoor et al., 2017). Cette stratégie est cependant peu spécifique du fait de l'activité à large spectre de la plupart des antibiotiques éliminant ainsi des bactéries pathogènes et bénéfiques. Des chercheurs essaient de contourner cet inconvénient en développant des antibiotiques qui cibleraient des composants spécifiques tels que les récepteurs aux phéromones exprimés à la membrane cellulaire (Xu, Shao, et al., 2020).

Phagothérapie

Une alternative à l'usage d'antibiotiques, qui limitent la sélectivité des bactéries ciblées et favorisent le développement de bactéries multi-résistantes, est l'utilisation de virus pouvant infecter naturellement les bactéries : les phages ou bactériophages [Figure 9D]. Leur fonctionnement est similaire à celui des autres virus : ils se multiplient dans la cellule bactérienne induisant sa lyse (cycle lytique) et/ou intègrent leur ADN viral à l'ADN bactérien formant ainsi un prophage (cycle lysogénique). Les phages présentent l'avantage d'avoir une spécificité étroite avec leur cible bactérienne et présentent une efficacité pour traiter des infections intestinales non-corrigées par un traitement antibiotique (Dufour & Debarbieux, 2017; Sausset et al., 2020). Une telle thérapie a montré des effets prometteurs dans le traitement des infections à *Clostridium difficile* ou *Escherichia coli*, sans induire une dysbiose intestinale comme peuvent le faire les antibiotiques (Gutiérrez & Domingo-Calap, 2020).

Transplantation fécale

La transplantation fécale consiste à implanter le microbiote fécal d'un sujet donneur à un sujet receveur [Figure 9E]. Elle fut utilisée pour la première fois au quatrième siècle en Chine pour traiter des patients ayant ingéré de la nourriture empoisonnée (F. Zhang et al., 2012). Cette technique est maintenant utilisée pour traiter les infections bactériennes à *Clostridium Difficile* (Cammarota et al., 2014) et plus récemment étudiée dans des essais cliniques pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin tels que la maladie de Crohn ou les colites ulcéreuses (Levy & Allegretti, 2019). Différentes voies de transplantation peuvent être utilisées : voie rectale par colonoscopie ou voie orale avec des capsules ou un tube nasogastrique (Ramai et al., 2019).

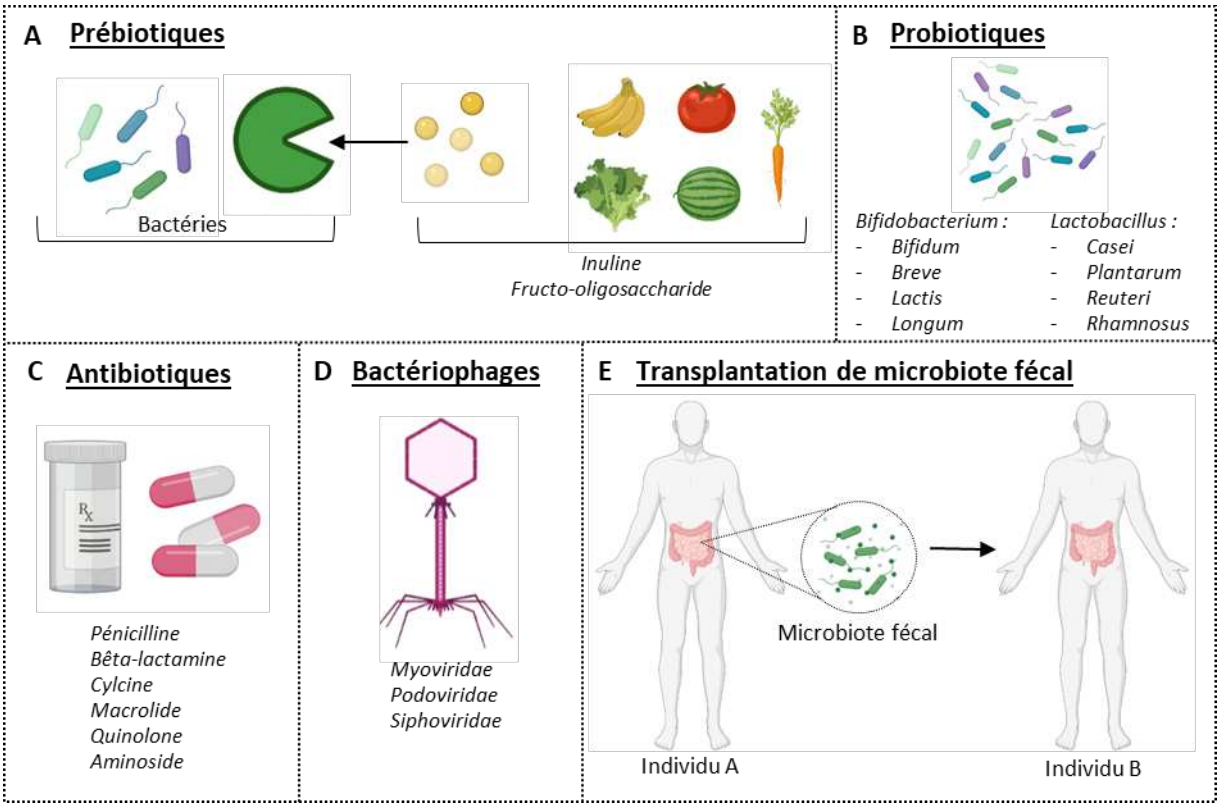


Figure 9 – Les techniques de modulation du microbiote intestinal

Représentation schématique des différentes techniques de modulation du microbiote intestinal avec l'utilisation de prébiotiques (A), probiotiques (B), antibiotiques (C), bactériophages (D) ou la transplantation fécale de microbiote (E).

3. Environnement du microbiote intestinal

a. Anatomie générale de l'intestin

Le tube digestif, composé de l'œsophage, estomac, intestin grêle, colon et rectum, est constitué de quatre couches communes à tous les segments [Figure 10] (Beaugerie et al., 2014). La première couche correspond à la muqueuse, elle-même divisée en trois parties : l'épithélium qui est en contact permanent avec le microbiote intestinal, la lamina propria contenant le GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissu*) et la muqueuse musculaire correspondant à une fine couche de cellules musculaires lisses. Afin d'augmenter sa surface, la muqueuse forme des plis muqueux, l'épithélium contient des villosités et cryptes intestinales, et les cellules épithéliales possèdent des microvillosités au niveau apical. La deuxième couche, la sous-muqueuse, est constituée de tissus conjonctifs et d'une partie du système nerveux entérique, le plexus sous-muqueux de Meissner. La troisième couche appelé la musculeuse est composée de deux couches de cellules musculaires lisses, une circulaire interne et une longitudinale externe. Une partie du système nerveux entérique, le plexus myentérique d'Auerbach, se situe entre ces deux couches. La quatrième et dernière couche correspond à la sous-séreuse uniquement constituée de tissus conjonctifs.

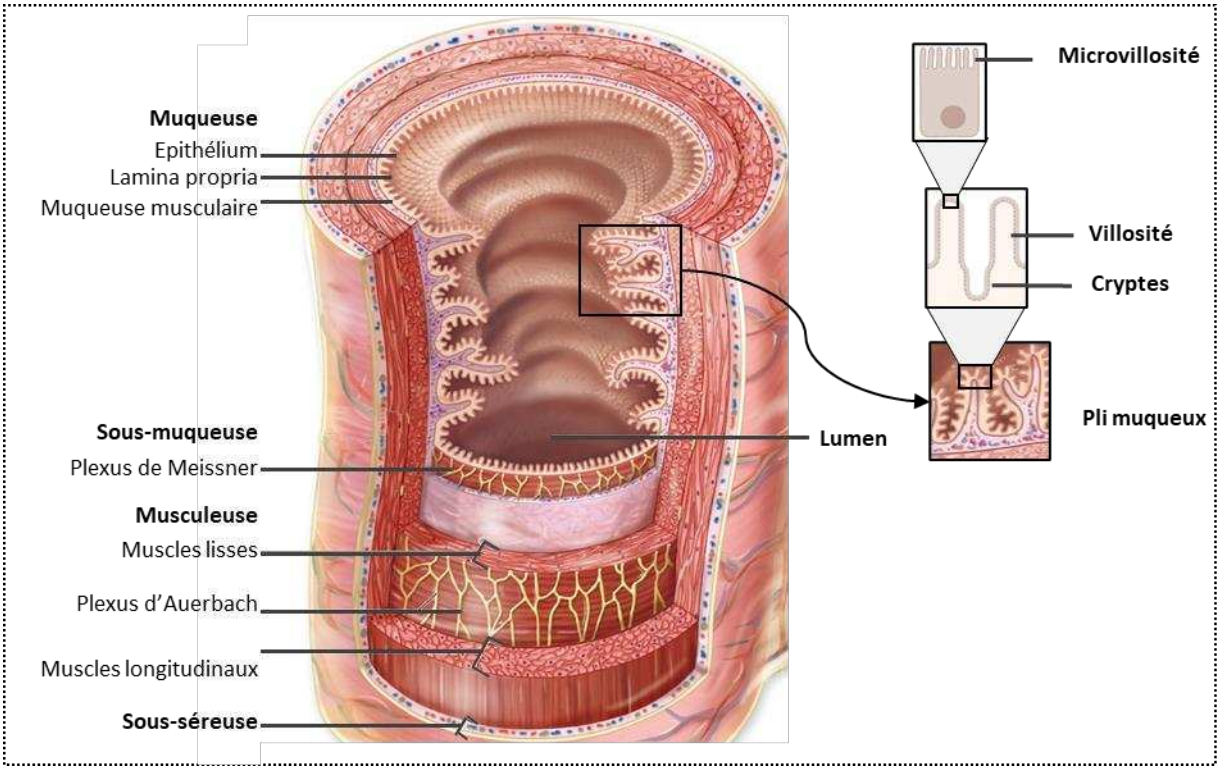


Figure 10 – Les couches composant la paroi intestinale

Schéma adapté de Junquiera's Basic Histology 15th edition et représentant les quatre couches de la paroi intestinale ainsi que les différents repliements permettant d'augmenter la surface épithéliale.

b. Diversité cellulaire de l'épithélium

L'épithélium intestinal contient de nombreux types cellulaires produit par les cellules souches au niveau des cryptes intestinales. Chacun de ces types cellulaires a une fonction principale spécifique résumé dans le tableau suivant [Figure 11] (Clevers & Bevins, 2013; Gerbe et al., 2012; Gribble & Reimann, 2019; Knoop & Newberry, 2018; Mabbott et al., 2013a; Snoeck et al., 2005; van der Flier & Clevers, 2009).

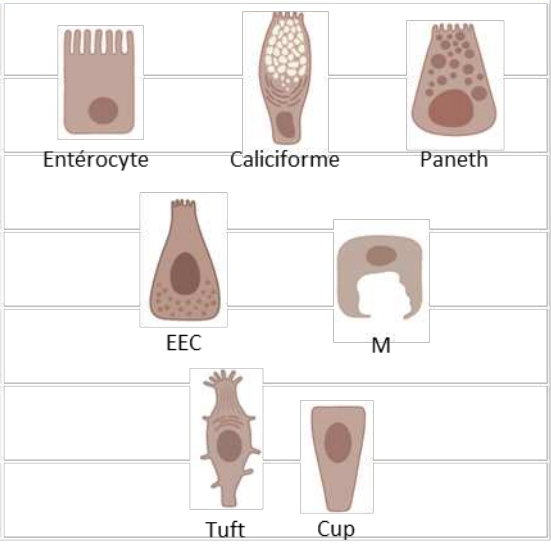
Type cellulaire	Fonction	Morphologie
Entérocyte > 80%	Protection et absorption des nutriments	
Caliciforme ~ 5-15%	Barrière : production de mucus	
Paneth < 1%	Immunitaire : synthèse de peptides anti-microbiens	
Entéroendocrine (EEC) < 1%	Endocrine : production d'hormones et peptides	
M *(microfold)* < 1%	Immunitaire : endocytose d'antigènes	
Tuft < 1%	Immunitaire : impliquée dans l'immunité de type 2	
Cup ~ 6%	Non-connue	

Figure 11 – La diversité cellulaire au sein de l'épithélium intestinal
Représentation schématique des différents types cellulaires retrouvés au sein de l'épithélium intestinal ainsi que leurs fonctions et morphologies respectives.

c. Réseau nerveux

Le tractus gastro-intestinal est tapissé d'un réseau nerveux divisé en deux parties : un réseau intrinsèque appelé le SNE (système nerveux entérique) et un réseau extrinsèque composé de fibres parasympathiques et orthosympathiques.

i. Réseau intrinsèque

Le SNE est considéré comme une troisième subdivision du système nerveux autonome et permet de réguler la motilité et les sécrétions de tout le tractus gastro-intestinal. Il est composé de circuits nerveux qui sont présents dans le plexus sous-muqueux de Meissner et le plexus myentérique d'Auerbach, et est composé de trois type de neurones [Figure 12] (Costa et al., 2000; Furness, 2000; J. G. P. Phillips, 1910) :

- Les neurones sensitifs ou IPAN (*Intrinsic Primary Afferent Neuron*) présents dans les deux plexus. Ils innervent la muqueuse intestinale et répondent à des stimuli chimiques ou mécaniques.
- Les neurones effecteurs principalement présents dans le plexus myentérique d'Auerbach et constitués de motoneurones ascendants excitateurs et descendants inhibiteurs innervant les couches musculaires lisses. Leur activité opposée induit une contraction au niveau proximal et une relaxation au niveau distal permettant l'avancement du contenu intestinal. Il existe également une faible proportion de neurones sécréteurs présents uniquement dans le plexus sous-muqueux de Meissner.
- Les interneurones présents dans le plexus myentérique d'Auerbach qui stimulent les motoneurones ascendants inhibiteurs ou descendants excitateurs suite à leur activation par les IPAN.

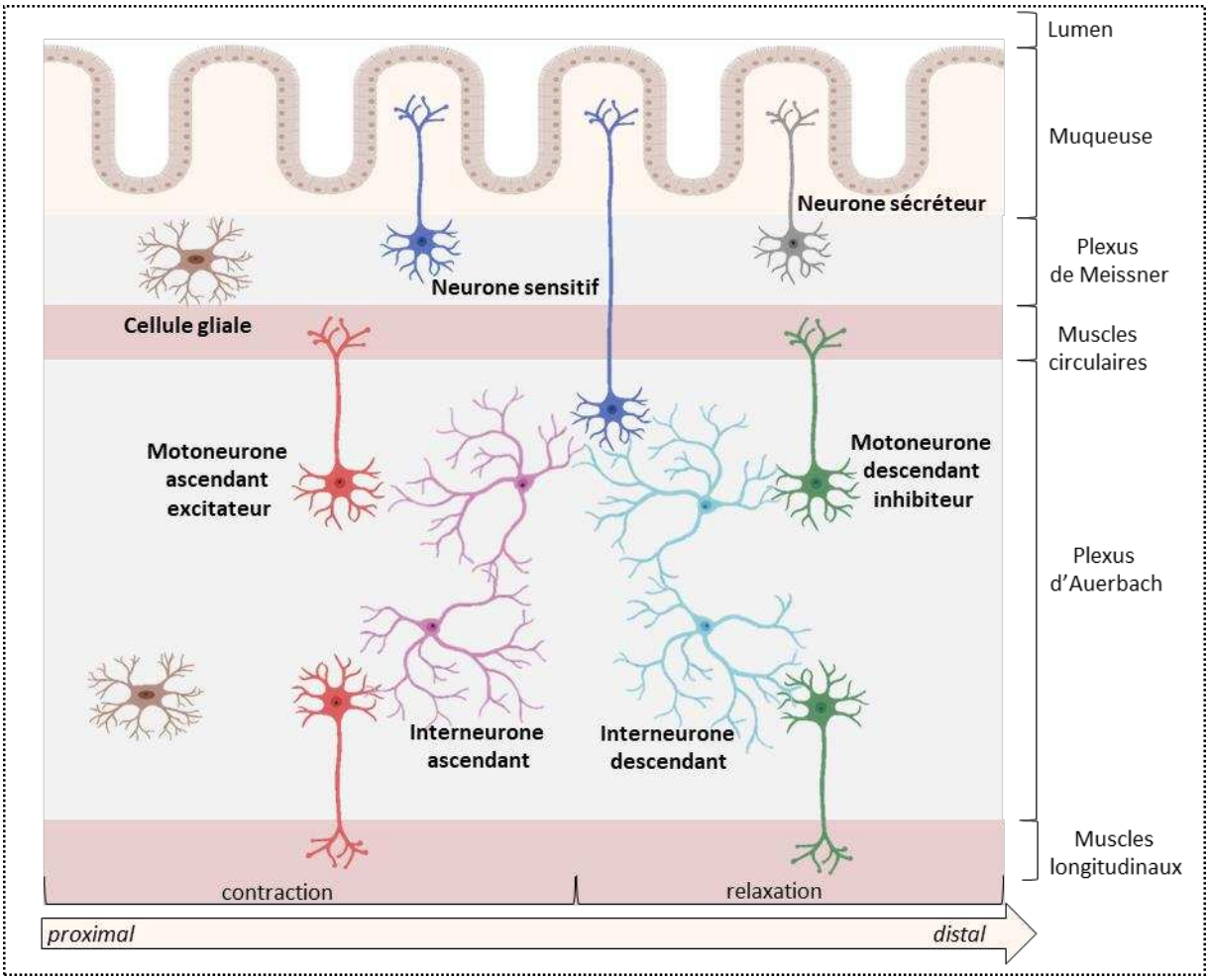


Figure 12 – Le système nerveux entérique

Représentation schématique des différents types neuronaux du système nerveux entérique.

Il a également été démontré la présence de cellules gliales entériques dans les plexus nerveux qui répondent à des signaux purinergiques et qui ont un rôle essentiel dans le développement du SNE au cours du développement et dans l'activité des circuits neuronaux locaux contrôlant la motilité intestinale. Ces cellules sont également présentent au niveau de la muqueuse intestinale où elles modulent le développement et la maturation des cellules épithéliales (Chow & Gulbransen, 2017).

Ce SNE est décrit tel que le second cerveau du corps humain (Gershon, 1999) en raison des 600 millions de neurones qui le composent et de la présence des circuits neuronaux locaux lui permettant d'assurer ses fonctions de manière autonome. Il communique cependant avec le SNC (système nerveux central) via un réseau extrinsèque.

ii. Réseau extrinsèque

Fibres parasympathiques

Le réseau extrinsèque est composé de fibres parasympathiques correspondant en grande majorité aux fibres du nerf vague, dont 70-80% sont afférentes, qui innervent l'ensemble du tractus digestif à l'exception du côlon distal innervé par des fibres sacrales.

Les afférences du nerf vague proviennent du ganglion inférieur du nerf vague et innervent la muqueuse, où elles forment des terminaisons libres afférentes au niveau de l'épithélium intestinal, et la musculeuse où elles forment des IGLE (*intraganglionnic laminar ending*) et IMA (*intramuscular array*). Les informations provenant de ces fibres sont relayées dans le bulbe rachidien au niveau du CVD (complexe vagal dorsal) comprenant le NS (noyau solitaire) et le NMDX (noyau moteur dorsal du nerf vague) où prennent origine les efférences vagales. [Figure 13]. Ce complexe forme un centre intégrateur majeur. Il projette et reçoit des informations des noyaux hypothalamiques – noyau arqué et noyau paraventriculaire – du noyau central de l'amygdale, de la strie terminale et du cortex frontal permettant un contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme et de la contraction et sécrétion intestinale (Browning & Travagli, 2014; M. B. Hansen, 2003; M. Rao & Gershon, 2016; Waise et al., 2018; X. Zhang et al., 2003).

Fibres orthosympathiques

Les fibres afférentes orthosympathiques relaient les informations jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. Il s'en suit une transmission efférente aux neurones préganglionnaires qui connectent avec les neurones postganglionnaires au niveau des ganglions prévertébraux. Les neurones postganglionnaires innervant l'estomac sont contenus dans le ganglion cœliaque, ceux innervant les intestins dans les ganglions mésentériques supérieurs et inférieurs, et ceux innervant le côlon dans le ganglion pelvien [Figure 13]. Ces fibres orthosympathiques innervent les couches musculaires lisses, les vaisseaux sanguins, les neurones du SNE et les plaques de Peyer et permettent une modulation du péristaltisme, du flux sanguin, de la sécrétion et du système immunitaire intestinal (Browning & Travagli, 2014).

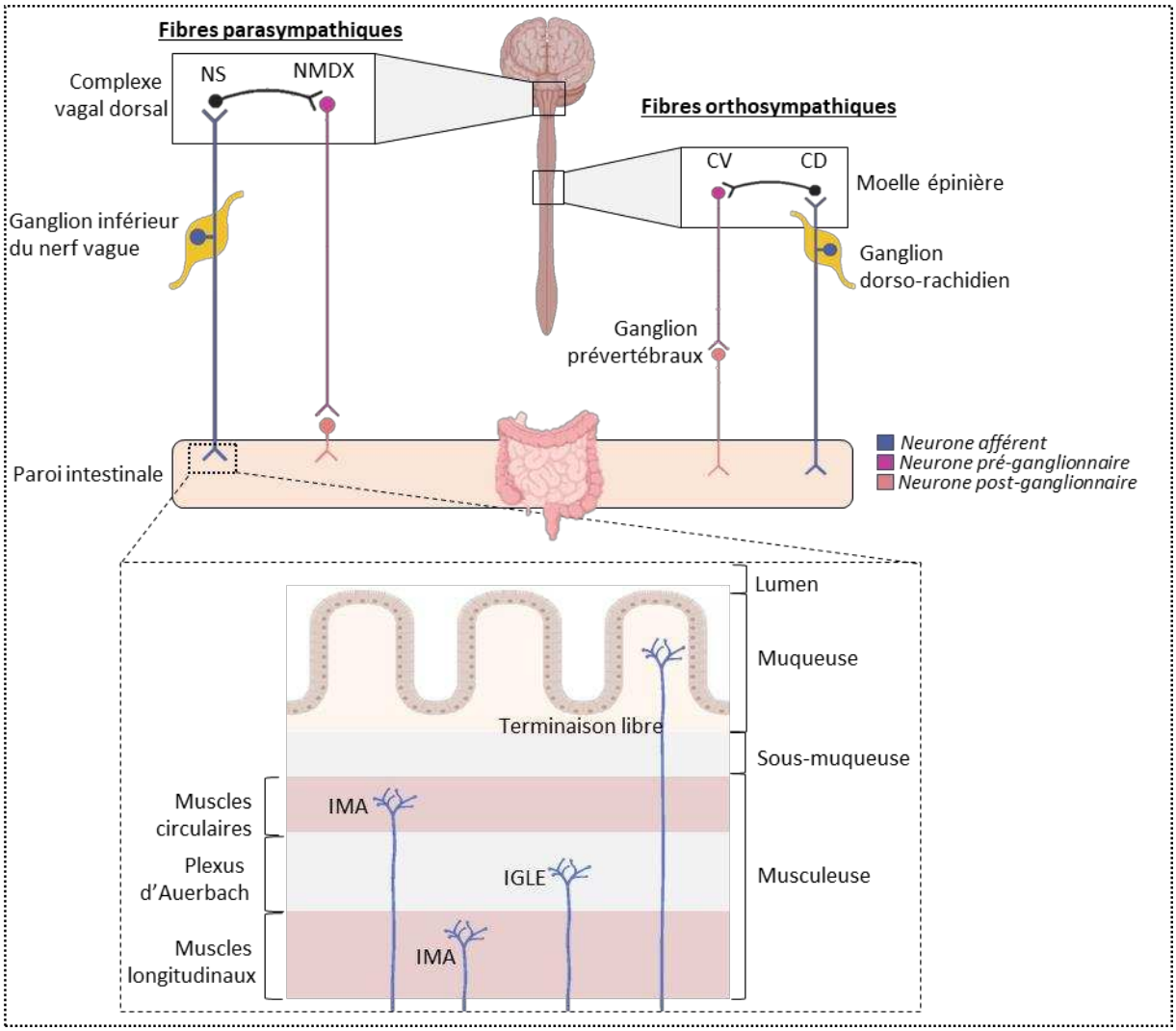


Figure 13 – Le réseau extrinsèque de la paroi intestinale

Représentation schématique des réseaux de fibres vagales parasympathiques et orthosympathiques innervant la paroi intestinale ainsi que les différentes afférences vagales.

NS: noyau solitaire. NMDX: noyau moteur dorsal du nerf vague. CV: corne ventrale. CD: corne dorsale. IMA: intramuscular array. IGLE: intraganglionnic laminar ending.

d. Réseau immunitaire

Une grande partie du tractus gastro-intestinal est occupé par le tissu lymphoïde, le GALT, localisé au niveau de la lamina propria. Il comprend les plaques de Peyer présentes de manière abondante au niveau de l'iléon et les ILF (*isolated lymphoid follicles*) (Brandtzaeg et al., 2008). Les plaques de Peyer ont une organisation spécifique contrairement aux ILF. Elles possèdent un centre germinatif (CG) où a lieu la maturation des LB (lymphocytes B), une zone enrichie en LB et une zone de LT (lymphocyte T).

L'épithélium associé à ces follicules (FAE – *follicule associated epithelium*) possède des cellules spécialisées, les cellules M, permettant la transcytose d'antigènes bactériens, alimentaires ou cellulaires vers les cellules immunitaires. Ces cellules présentent une absence de microvillosité au niveau apical, et une invagination (ou poche) au niveau basolatéral. Cette poche permet de réduire la distance entre la surface apicale et basolatérale pour la transcytose des vésicules contenant les antigènes (Mabbott et al., 2013b).

e. Réseau glial

Citons également la présence de cellules entériques gliales qui présentent une morphologie similaire aux astrocytes présents dans le SNC et expriment les marqueurs GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et S-100β. Elles sont situées au niveau des cryptes où elles peuvent interagir avec les cellules épithéliales et également étendre leurs prolongements au niveau des capillaires sanguins de la muqueuse intestinale en formant des pieds astrocytaires, mais elles sont également retrouvées en plus forte majorité dans les ganglions entériques au niveau des plexus neuronaux (Y.-B. Yu & Li, 2014). Il a été démontré qu'elles modulent l'inflammation via la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires et jouent également un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale : une altération de la barrière dans un modèle murin BALB/c engendrée par une brûlure peut être prévenue par la stimulation des récepteurs nicotiniques du nerf vague et est associé à une activation des cellules entériques gliales (Costantini et al., 2012).

CHAPITRE 2

L'AXE MICROBIOTE INTESTINAL / CERVEAU

II – L'axe microbiote intestinal / cerveau

Durant le 19ème siècle, de nombreux docteurs accordaient une grande importance aux intestins et les considéraient comme l'organe le plus important du corps humain en raison de leur influence sur le bien-être émotionnel. L'existence de cette relation intestin – cerveau fut appuyée par l'observation des conséquences engendrées par une consommation excessive de thé par les femmes durant l'époque victorienne au Royaume-Uni : elles développaient une dyspepsie suivie de problèmes mentaux (I. Miller, 2018). D'autres découvertes scientifiques durant le 20ème siècle, telles que le traitement de la dépression par un changement de régime alimentaire (J. G. P. Phillips, 1910) ou l'augmentation du taux d'histamine cérébrale chez des rats axéniques en comparaison à des rats conventionnels (Hegstrand & Hine, 1986) ont permis de démontrer que le microbiote intestinal occupe une place majeure dans la relation intestin – cerveau, communément appelée l'axe microbiote intestinal-cerveau. Cette communication est permise grâce à l'action du microbiote intestinal sur les cellules immunitaires, endocrines et nerveuses de l'intestin [Figure 14].

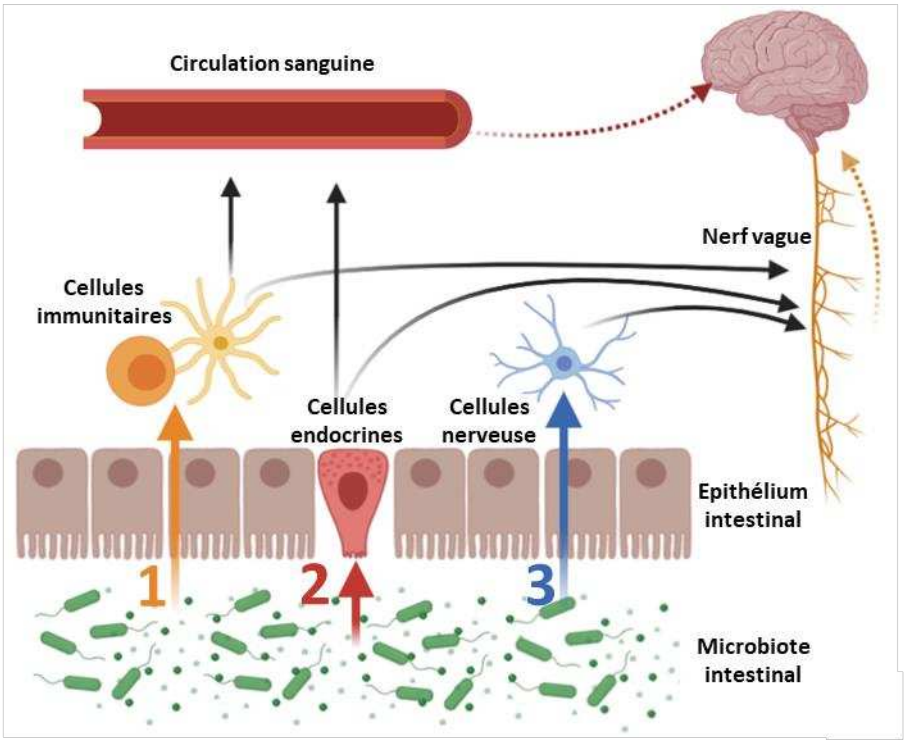


Figure 14 – Les voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau.
Le microbiote intestinal communique avec le cerveau via le nerf vague et la circulation sanguine par son interaction avec les cellules intestinales décrivant ainsi trois voies de communication majeures : 1/ voie immunitaire, 2/ voie endocrine et 3/ voie nerveuse.

1. Voies de communication

a. Les acteurs microbiens et leurs cibles

i. Composants microbiens et leurs récepteurs

Les composants bactériens peuvent agir sur des récepteurs PRR (*pattern recognition receptor*) membranaires et cytoplasmiques présentés dans la figure suivante [Figure 15]. Ces récepteurs sont principalement exprimés sur les cellules immunitaires et permettent l'induction d'une réponse immunitaire suite à une stimulation microbienne.

Récepteurs		Ligands microbiens
TLR	TLR1/2	Lipoprotéine
	TRL2/6	Lipoprotéine
	TRL2	Lipoprotéine, Peptidoglycane
	TRL3	ARN viral
	TRL4	LPS
	TRL5	Flagelline
	TRL7	ARN viral
	TLR8	ARN viral
	TRL9	ADN CpG
CLR	Dectin-1	B-glucane
	Dectin-2	Mannose
	Mincle	Mannose
NLR	NOD1	DAP
	NOD2	MDP
	NLRP3	Toxines, ATP
RLR	RIG-1	ARN viral
	MDA5	ARN viral
Localisation		

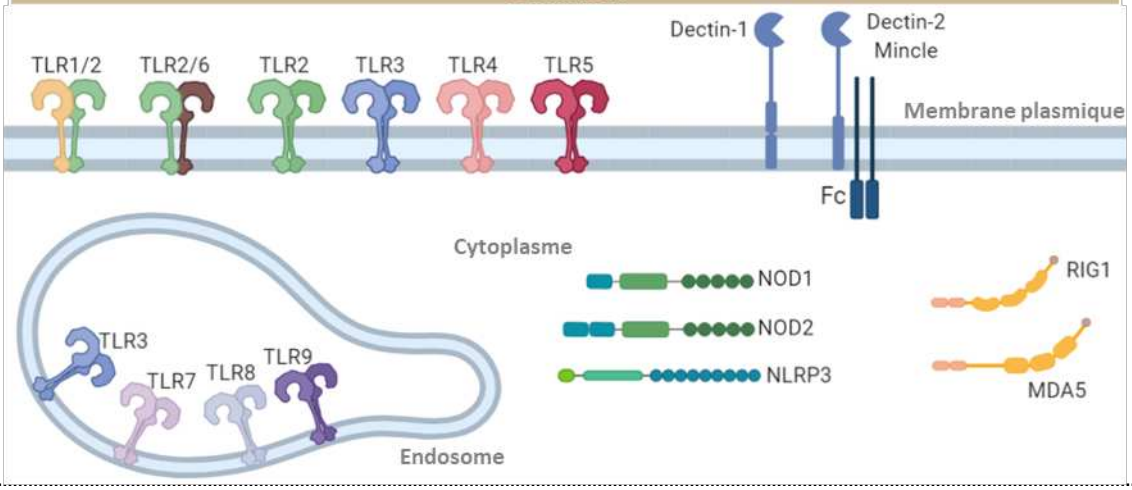


Figure 15 – Les différents récepteurs PRR et leurs ligands

Représentation schématique de la localisation des différents récepteurs PRR ainsi que le tableau non-exhaustif de leurs ligands adapté de Mogensen 2009.

TLR : Toll-like receptor. CLR : C-type lectin receptor. RLR : Rig-1-like receptor. NLR : Nod-like receptor. LPS : lipopolysaccharide. DAP : diaminopimelic acid. MDP : Muramyl dipeptide. ATP : adénosine triphosphate.

Les récepteurs PRR membranaires

Les « Toll-like receptors »

Les récepteurs TLR peuvent être exprimés au niveau de la membrane extracellulaire mais également sur les membranes endosomales. Leur activation par leurs ligands entraîne le recrutement des protéines adaptatrices Myd88 (*myeloid differentiation primary response 88*) ou TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon*-β). L'ensemble des récepteurs TLR peut utiliser la protéine Myd88 à l'exception du récepteur TLR3.

Le complexe ligand-récepteur-Myd88 entraîne le recrutement des kinases IRAK1 et IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1 et 4*) qui s'autophosphorylent. IRAK1 phosphorylée s'associe avec une protéine de la famille des facteurs associés aux récepteurs TNF (*tumor necrosis factor*), la protéine TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*).

Le complexe ligand-récepteur-TRIF quant à lui active la protéine TRAF3 ou peut également activer TRAF6 via la protéine kinase RIPK1 (*receptor interacting protein kinase*) (Cusson-Hermance et al., 2005; Kawasaki & Kawai, 2014) [Figure 16A].

Les « C-type lectin receptors »

Les récepteurs CLR reconnaissent des groupements β-glucanes, tels que le récepteur Dectin-1 (*Dendritic cell-associated C-type lectin*) ou des groupements mannoses, tels que les récepteurs Dectin-2 et Mincle (*macrophage-inducible C-type lectin*). Leur activation entraîne respectivement le recrutement de la protéine ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), ou de la protéine ITAM associée à une protéine adaptatrice Fc (fragment cristallisable). Ce complexe ligand-récepteur-ITAM recrute la protéine kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) qui active la protéine PKCδ (protéine kinase C δ). Cette dernière active le complexe CBM , composé des protéines CARD9-Bcl10-MALT1 (*caspase activation and recruitment domain / β-cell lymphoma / mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*) qui peuvent activer TRAF6 (T.-H. Li et al., 2019) [Figure 16B].

Les récepteurs PRR cytoplasmiques

Les « Nod-like receptors »

Les deux principaux NLR qui reconnaissent les composants bactériens sont les récepteurs NOD1 et NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 1* et *2*) appartenant à la famille des récepteurs NLR dotés d'un domaine CARD, les NLRC. Ces récepteurs reconnaissent

respectivement des peptidoglycanes exprimés par une majorité de bactéries Gram négatives telle que le iE-DAP (*γ-d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*) et des peptidoglycanes exprimés par toutes les bactéries telles que le MDP (*muramyl dipeptide*). Ils activent ensuite la protéine kinase RIPK2 permettant l'activation des protéines TRAF3 et TRAF6 (Y. K. Kim et al., 2016).

Le récepteur NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)* appartenant aux récepteurs NLR ayant un domaine pyrine est également un récepteur ayant un rôle majeur dans la reconnaissance microbienne. Il appartient à l'inflammasome NLRP3 composé du récepteur du même nom et des protéines ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et caspase-1 qui permettent la maturation de l'IL-1β (interleukine de type 1β) (J. J. Kim & Jo, 2013) [Figure 16C].

Les « Rig-1-like receptors »

Les récepteurs RLR sont composés des récepteurs RIG1 (*retinoic-acid inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) qui possèdent un domaine DEAD (motif asparagine-glutamine-alanaine-asparagine) permettant de se lier aux ARN viraux. Cette liaison engendre le recrutement de la protéine adaptatrice IPS-1 (*interferon-β promotor stimulator I*) également appelé MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*), et leur relocalisation au niveau des membranes mitochondriales. Ce complexe ligand-récepteur-IPS1 va engendrer l'activation des protéines TRAF3 et TRAF6 (Loo & Gale, 2011) [Figure 16D].

Les cascades de signalisation engendrées par l'activation des protéines TRAF3 et TRAF6 induisent la translocation nucléaire de facteurs de transcription permettant la production de cytokines pro-inflammatoire et d'interféron (IFN) de type I [Figure 16E].

La protéine TRAF6 activée va s'associer avec l'ubiquitine ligase E3. Ce complexe engendre la polyubiquitination K63 de la protéine TAK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7,* ou *MAPKKK7*) et permet son activation.

TAK1 peut activer la voie NF-κB (nuclear factor-κ-B) : elle phosphoryle le complexe IKK (*inhibitor of nuclear factor-κ-B kinase*) qui phosphoryle le facteur IκB (*inhibitor of nuclear factor-κ-B*) entraînant sa polyubiquitination K48 et sa dégradation. Ce facteur étant un inhibiteur du facteur de transcription NF-κB, sa dégradation permet la translocation nucléaire du facteur NF-κB. TAK1 peut également activer la voie des MAPK (*mitogen-activated protein*

kinase) avec les facteurs ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), P38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) permettant l'activation et la translocation du facteur de transcription AP-1 (*activator protein 1*).

La protéine TRAF3 activée permet l'activation de la protéine kinase TBK1 (*TANK-binding kinase-1 / TANK : TRAF family member-associated NF-κB*) engendrant la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (*interferon regulatory factor 3* et *7*) et leur translocation nucléaire.

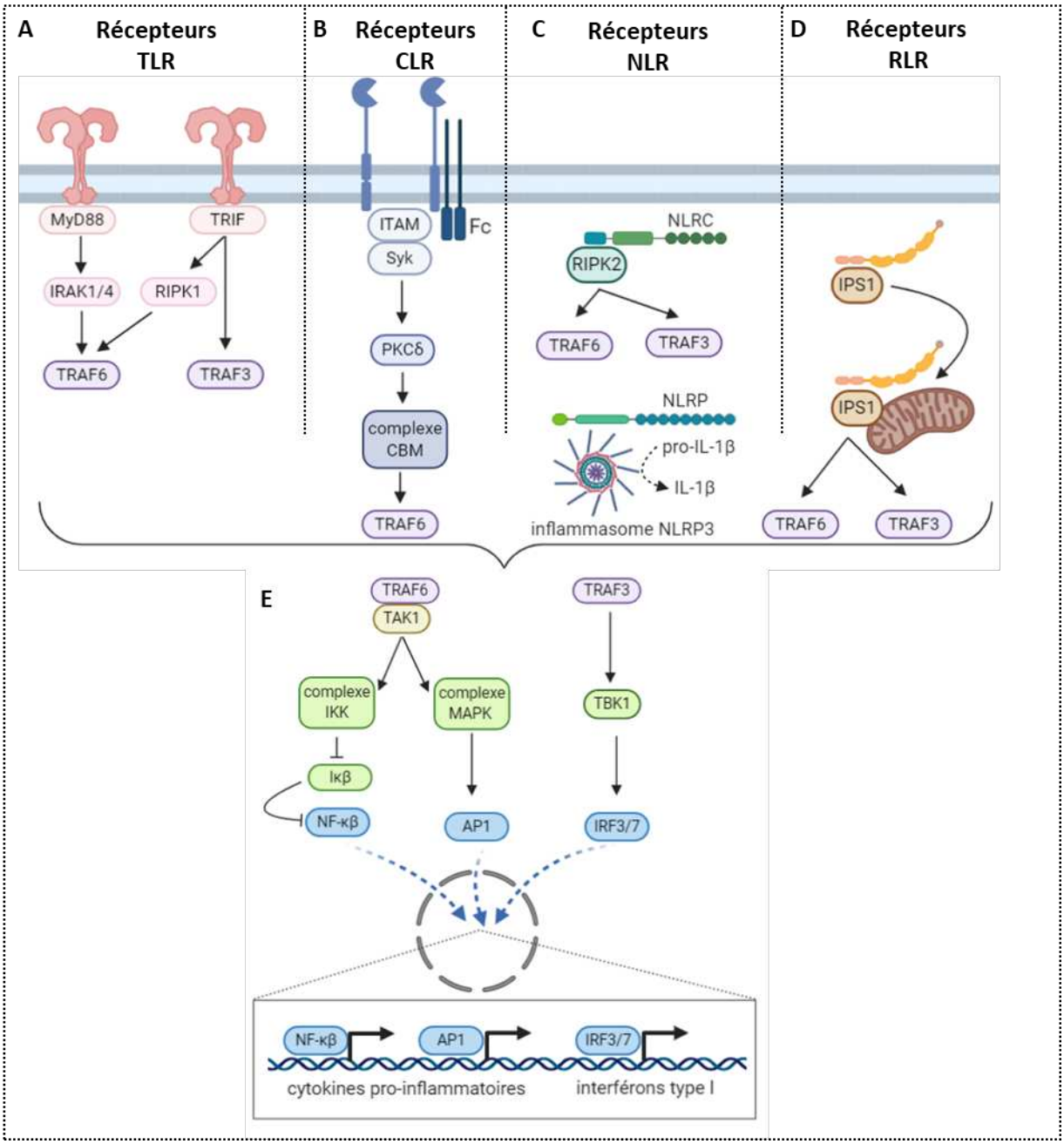


Figure 16 – Les voies de signalisation des récepteurs PRR menant à une réponse immunitaire

Les composants bactériens vont agir sur les différents récepteurs TLR (Toll-like receptor), CLR (c-type lectin receptor), NLR (NOD-like receptor) et RLR (RIG1-like receptor) induisant la translocation nucléaire de facteurs de transcription permettant la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type I.

ii. Métabolites bactériens et leurs récepteurs

Les bactéries produisent de manière continuelle de nombreux métabolites provenant majoritairement du métabolisme des glucides, des acides aminés et des lipides (Y. Ji et al., 2019; Neis et al., 2015; Postler & Ghosh, 2017).

Les acides gras à chaîne courte

L'acétate, le butyrate et le propionate sont les principaux métabolites bactériens de la classe des acides gras à chaine courte (AGCC). Ils se lient à des RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) : GPR41 (*G-protein regulator 41*) ou FFAR3 (*free-fatty acid receptor 3*), GPR43 ou FFAR2, GPR109a et OLFR78 (*olfactory receptor 78*). GPR43 peut se lier à l'ensemble des AGCC, GPR41 au propionate et butyrate, GPR109a au butyrate, et OLFR78 à l'acétate et propionate. Les AGCC bactériens peuvent également agir au niveau intracellulaire, suite à leur passage au travers de la membrane par des transporteurs tels que Slc16a1 et Slc5a8 (*solute carrier 16a1* et *5a8*) (Corrêa-Oliveira et al., 2016), et inhiber les HDAC (histones désacétylases) induisant des remodelages de la chromatine et modulant ainsi la transcription.

Les acides biliaires

Le cholestérol est métabolisé par les hépatocytes en acides biliaires tel que l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, qui sont ensuite transformés en acides biliaires secondaires tels que l'acide lithocholique, l'acide désoxycholique et l'acide ursodéoxycholique par les bactéries intestinales. Ces métabolites peuvent agir sur le RCPG GPBAR1 (*G protein-coupled bile acid receptor-1*), ou TGR5, et sur le récepteur nucléaire FXR (*Farnesoid X receptor*).

Le métabolisme du tryptophane

Le tryptophane, acide aminé essentiel pour l'organisme, peut être métabolisé selon trois voies métaboliques principales: la voie de la kynuréine, la voie de l'indole et la voie de la sérotonine (Taleb, 2019) [Figure 17].

La voie de la sérotonine est minoritaire et est due à l'expression de l'enzyme Tph1 (*tryptophane hydroxylase 1)* par les cellules épithéliales intestinales dont l'expression est modulée par le microbiote intestinal (Reigstad et al., 2015; Yano et al., 2015). La voie de la kynuréine entraîne la production de kynuréine et de nombreux dérivés tels que l'acide kynuréique, l'acide quinolinique et l'acide picolonique qui ciblent les récepteurs NMDA (*N-methyl-d-aspartic acid*), α-7 nAChR (récepteur nicotinique de l'acétylcholine de type α-7 /

ACh : acétylcholine) et GPR35 (Dehhaghi et al., 2019; J. Wang et al., 2006). La voie de l'indole permet, *via* la tryptophanase exprimée par les bactéries, la production d'indole et de ses dérivés tels que l'indole-3-aldéhyde, l'acide indole-3-acétique et l'acide indole-3-propionique. La tryptophane décarboxylase bactérienne, exprimée par seulement 10% de la population d'après le HMP (*Human Microbiota Project*), permet également de métaboliser le tryptophane en tryptamine (Williams et al., 2014). Ces métabolites exercent leurs effets via des récepteurs nucléaires tels que AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) et PXR (*pregnane X receptor*), ou *via* le récepteur de la sérotonine de type 4 (5-HT_4R / 5-HT : 5-hydroxytryptamine, ou sérotonine) (Bhattarai et al., 2018).

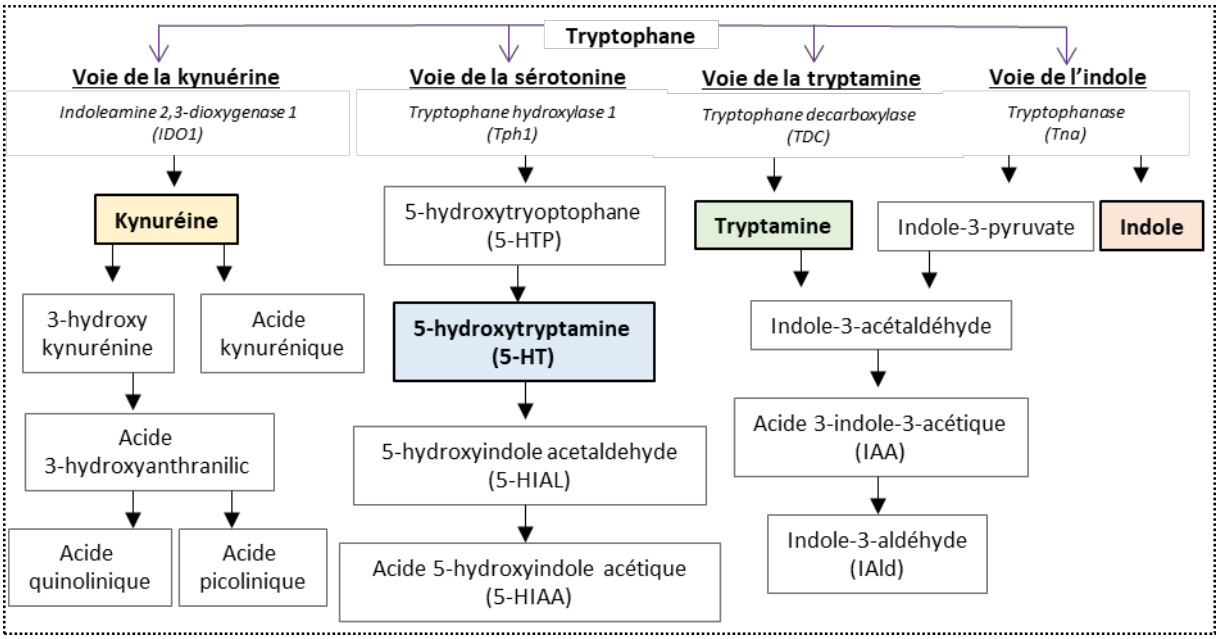


Figure 17 – Le métabolisme du tryptophane

Représentation schématique des voies de la kynuréine, de la sérotonine, de la tryptamine et de l'indole provenant du métabolisme du tryptophane.

Les neurotransmetteurs

D'autres neurotransmetteurs que la sérotonine peuvent être produit par le microbiote intestinal tels que le l'ACh , le GABA (*γ-aminobutyric acid*) et les catécholamines dopamine et noradrénaline (Roshchina, 2010; Strandwitz, 2018; Sudo, 2019) qui agissent sur des récepteurs spécifiques, détaillés dans une prochaine section.

De nombreux autres métabolites tels que la triméthylamine et ses précurseurs (choline et carnitine), les polyphénols, les dérivés de l'arginine (putrescine, spermidine, spermine, citrulline, ornithine, agmatine), l'ATP, les acides gras à chaîne ramifiée (isovalerate, isobutyrate, valerate) et les dérivés histidine (histamine, imidazole propionate) sont également produits par le métabolisme bactérien.

b. Microbiote et cellules endocrines

Les cellules endocrines intestinales ou enteroendocrines représentent 1% des cellules épithéliales intestinales. Le tableau 1 ci-dessous résume les différents types cellulaires endocriniens existants et leurs principales hormones sécrétées.

Types de cellules endocrines	Hormone majoritairement sécrétée
A	Ghréline, nefastine-1
D	Somatostatine
EC	5-HT
ECL	Histamine
G	Gastrine
I	CCK
K	GIP
L	GLP, PYY
M	Motiline
N	Neurotensine
S	Sécrétine
P	Leptine

Tableau 1 – Les différentes cellules endocrines intestinales et les hormones sécrétées
Adapté de Yu et al. 2020. EC : enterochromaffin cell. ECL : enterochromaffin cell-like. 5-HT : 5-hydroxytryptamine. CCK : cholécystokinine. GIP : gastric inhibitory polypeptide. GLP: glucacon-like peptide. PYY : peptide tyrosine tyrosine.

Des études ont démontré que le microbiote intestinal peut induire l'augmentation de l'expression de l'enzyme Tph1 par les cellules entérochromaffines (EC) permettant la production de 5-HT à partir du tryptophane (Yano et al., 2015), et qu'un traitement avec des prébiotiques stimule la différenciation des cellules souches intestinales en cellules de type L (Cani, Hoste, et al., 2007).

D'un point de vue mécanistique, ces cellules expriment des récepteurs répondant aux composants bactériens et aux AGCC tels que TLR2, TLR4, GPR41, GPR43 et GPR109a. De même, elles expriment le récepteur T2R38 (ou T2R138 chez la souris – *T2R : taste receptor 2*) qui est en capacité de répondre aux homosérines lactones impliquées dans la détection du

quorum des bactéries gram négatives, le récepteur OLFR558 répondant au métabolite bactérien isovalérate, et le récepteur 5-HT_4 répondant à la sérotonine (Bellono et al., 2017; Hoffman et al., 2012; Viswanathan, 2013).

La modulation de l'activité des cellules endocrines entraîne donc des variations plasmatiques des différentes hormones intestinales qui peuvent agir au niveau cérébral, notamment dans les comportements de prise alimentaire. Une étude a démontré qu'un traitement avec des prébiotiques administré à des souris engendre une augmentation des taux de GLP1 et PYY plasmatiques, associée à une augmentation de la satiété (Cani, Lecourt, et al., 2009).

c. Microbiote et cellules immunitaires

En présence d'antigènes, les lymphocytes T (LT) vont maturer en LT auxiliaires (Th – lymphocyte *T helper*), régulateurs (Treg) ou cytotoxiques. Les Th17 et Treg Foxp3+ (*forkhead box P3*) sont les deux types lymphocytaires majeurs ayant un rôle au niveau de la réponse inflammatoire intestinale, et sont fortement modulés par le microbiote intestinal (Omenetti & Pizarro, 2015). Il a été démontré que les bactéries SFB activent la différenciation des Th17 (Ivanov et al., 2009), *Bacteroides fragilis* active le développement des Treg Foxp3+ et stoppe le développement des Th17 (Round et al., 2011) et les bactéries du genre *Clostridium* induisent le développement de Treg (Atarashi et al., 2011). D'un point de vue mécanistique, les AGCC sont l'un des premiers acteurs modulant le système immunitaire.

Le lactate et le pyruvate induisent l'extension de protrusions dendritiques *via* le récepteur GPR31 des cellules CX3CR1+ (récepteur 1 de la chimiokine CX3C / CX3C : fractalkine) (Morita et al., 2019). L'acétate et le butyrate engendrent la production d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques *via*, respectivement, les récepteurs GPR42 et GPR109a, permettant la production d'IgA sécrétoires (W. Wu et al., 2017) et la différenciation des Treg (Furusawa et al., 2013; Singh et al., 2014), et permettent *via* leurs actions sur les HDAC de moduler la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tel que Foxp3+ (Lucas et al., 2009; Silva et al., 2018).

Les cytokines circulantes, produites suite à l'activation des cellules immunitaires, peuvent passer la BHE (barrière hémato-encéphalique) (Banks et al., 1995) et avoir une interaction directe avec le cerveau, ou peuvent déstabiliser la BHE augmentant ainsi sa perméabilité (Varatharaj & Galea, 2017). Des études ont par ailleurs démontré qu'une modulation immunitaire par le microbiote permet d'engendrer ou de soigner des troubles cérébraux (Fung

et al., 2017). L'administration du probiotique *Lactobacillus johnsonii* dans un modèle murin ICR de colite permet de restaurer la dysbiose intestinale, diminuer l'inflammation, et corriger les déficits de mémoire présents dans ce modèle (Jang et al., 2018). De même, l'administration de *Bifidobacterium infantis* permet de diminuer l'inflammation et de corriger les déficits comportementaux dans le modèle de dépression de séparation maternelle chez le rat Sprague-Dawley (Desbonnet et al., 2010).

d. Microbiote et cellules nerveuses

Le nerf vague est la composante majeure de la voie nerveuse permettant au microbiote de communiquer avec le cerveau. Il a été démontré que l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* à des souris modifie l'expression cérébrale des différents récepteurs au GABA et que cet effet est perdu lors d'une vagotomie (Bravo et al., 2011). Par ailleurs, une transplantation fécale de microbiote dysbiotique provenant de souris stressées est en capacité de diminuer la neurogenèse hippocampique et d'induire des états dépressifs chez les souris receveuses, à condition que le nerf vague soit intact (Siopi et al., 2019).

D'un point de vue mécanistique, le nerf vague possède de nombreux récepteurs qui répondent au microbiote intestinal, tels que les récepteurs TLR2, TLR4, GPR41 et GPR35 (Brun et al., 2013; Egerod et al., 2018; Hosoi et al., 2005; Nøhr et al., 2015), et aux hormones et cytokines intestinales tels que les récepteurs CCK-A, GLP-1_R, $Y2_R$ (Y pour NPY : neuropeptide), $H2_R$ (H pour histamine), $H3_R$, IL-1_R et TNF-$1/2_R$ (Gray & Magnuson, 1987; M. B. Hansen, 2003; Steinberg et al., 2016). Les cellules nerveuses du SNE relayent des informations du microbiote intestinal au nerf vague *via* les récepteurs répondants aux ARN viraux – TLR3 et TLR7 – et aux composants et métabolites bactériens – TLR4 et FFAR3 (Barajon et al., 2009; Nøhr et al., 2013). Le nerf vague et le SNE expriment également de nombreux récepteurs qui répondent aux neurotransmetteurs résumés dans le tableau 2 (Bornstein, 2012; Egerod et al., 2018; Hyland & Cryan, 2010; Mittal et al., 2017; Ren & Bertrand, 2008; Seifi et al., 2014; Zhou & Verne, 2008).

Récepteurs sérotoninergiques	5-HT_{1A}	5-HT_3	5-HT_4			
Récepteurs cholinergiques	α3	α5	α7	β2	β4	M4
Récepteurs GABAergiques	GABA-A	GABA-B				
Récepteurs catécholaminergiques	A2	D1	D2	D3	D4	D5
Récpepteurs purinergiques	P2X	P2Y				
Récepteurs glutamatergiques	NR1					

Tableau 2 – Les récepteurs aux neurotransmetteurs exprimés par le système nerveux entérique

L'ensemble de ces récepteurs est exprimé de manière hétérogène. Ils sont exprimés au niveau des terminaisons libres des afférences mucosales présentes à proximité des villosités et des cryptes intestinales permettant un contact direct avec les ligands, au niveau des corps cellulaires dans le ganglion inférieur du nerf vague et dans le CVD (complexe vagal dorsal) du bulbe rachidien. A ce niveau, la BHE n'est pas entièrement intacte permettant aux neurones du NS (noyau solitaire) et du NMDX (noyau moteur dorsal du nerf vague) d'être accessibles aux ligands circulants (Maolood & Meister, 2009; Travagli, 2012).

2. Microbiote intestinal et homéostasie cérébrale

a. Barrière hémato-encéphalique

La BHE, présente autour des capillaires pénétrant le cerveau, est une barrière physique permettant d'isoler et de protéger le SNC contre les substances circulantes. Ce contrôle passif entre le système sanguin et nerveux lui confère un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cérébrale.

i. Composition de la BHE

La BHE se compose de trois types cellulaires formant une unité neurovasculaire : les cellules endothéliales (CE), les péricytes et les pieds astrocytaires (Kadry et al., 2020).

Les CE présentent un faible niveau de transcytose entre leur membrane luminale – en contact avec le système sanguin – et adluminale, et sont reliées entre elles par des jonctions serrées, créant ainsi une barrière paracellulaire et transcellulaire (Ayloo & Gu, 2019). Des péricytes entourent ces CE au niveau de leur membrane adluminale et sont en contact direct avec celle-ci via des jonctions communicantes. Elles ont un rôle immunitaire et de régulation du flux sanguin cérébral via leur fonction phagocytaire et contractile, et semblent avoir une activité de cellules souches multipotentes pouvant se différencier en lignée cellulaire vasculaire ou neuronale (L. S. Brown et al., 2019). Le dernier type cellulaire correspond aux pieds astrocytaires créant un lien direct entre les capillaires sanguins et le système neuronal. Ils ont un rôle dans la régulation du flux sanguin cérébral, dans l'expression des protéines des jonctions serrées, dans l'homéostasie de l'eau *via* l'expression d'aquaporines et dans la captation de glucose sanguin indispensable au fonctionnement cérébral (C. Y. Liu et al., 2018).

ii. Perméabilité de la BHE

La fonction de la BHE est primordiale pour réguler le passage de molécules entre le système sanguin et le SNC, dont les différents moyens de transport sont illustrés dans le tableau 3 (Pardridge, 2012; A. Wong et al., 2013).

Les organes circumventriculaires sont des zones cérébrales où la BHE est extrêmement perméable permettant des échanges importants avec le système sanguin : la glande pinéale, la neurohypophyse, l'éminence médiane, *l'area postrema*, l'organe subfornical, et l'organe vasculaire de la lame terminale (Kiecker, 2018).

Mécanisme	Composés
Diffusion passive	**Petites molecules (<400 Da) hautement liposolubles** - O_2, CO_2 - Anesthésique, barbiturique - Ethanol - Nicotine - Caféine - Hormones stéroïdes
Canaux	**Petites molecules et l'eau** - H_2O - Na^+ - K^+ - Cl^-
Transporteurs membranaires	- Glucose (GLUT-1) - Monocarboxylates, lactate, pyruvate (MCT1) - Créatine (CrT) - Acides aminées (LAT1, CAT1, ATA2 etc.) - Anions et cation organique (OAT et OCT) - Nucléosides (CNT, ENT) - Acides gras - Vitamines - ENT
Récepteurs membranaires	- Hormones (Insuline, Leptine etc.) - Transferrine - Cytokines
Transcytose médiée par adsorbtion	- Histone - Albumine

Tableau 3 – Mécanismes de transport *via* la barrière hémato-encéphalique
Adapté de A. Wong et al., 2013.

iii. Modulation de la BHE par le microbiote intestinal

L'intégrité de la BHE peut être altérée par le microbiote intestinal [Figure 18 & 23A]. En effet, l'étude de souris axéniques C57BL/6J a démontré une augmentation de la perméabilité de la BHE au stade fœtal et à l'âge adulte, associée à une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées Occludine et Claudine-5. La vascularisation cérébrale ainsi que les péricytes ne sont cependant pas impactés par l'absence de micro-organismes. Par ailleurs, ces défauts de perméabilité sont reversés aussi bien par une colonisation avec un microbiote fécal complet, avec des souches bactériennes spécifiques (*Clostridium tyrobutyricum* ou *Bacteroides thetaiotaomicron*) (Braniste et al., 2014). Une seconde étude sur des souris BALB/C traitées avec une faible dose d'antibiotique, la pénicilline, durant les premiers stades de vie montre une diminution de la perméabilité de la BHE associée avec une augmentation de l'expression des jonctions serrées. Cet effet est prévenu par l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* (Leclercq et al., 2017). Il est intéressant de noter que l'administration de l'espèce bactérienne *Clostridium butyricum* ou de butyrate de sodium sont également en capacité de

contrer l'augmentation de la perméabilité de la BHE dans un modèle murin C57BL/6 de trauma crânien (H. Li et al., 2016, 2018).

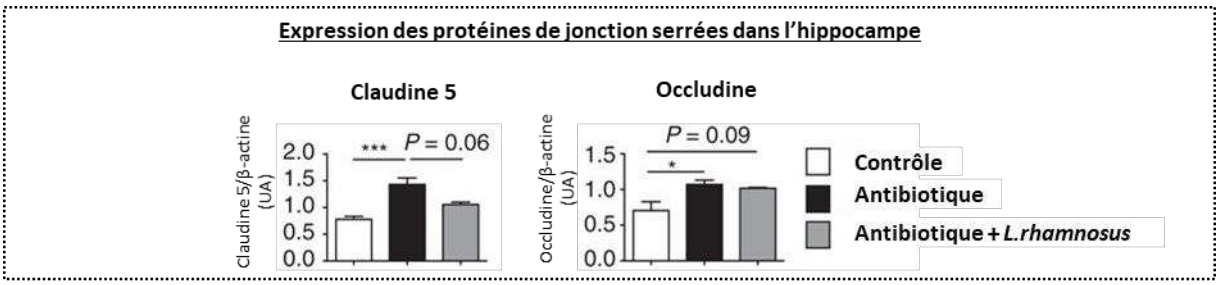


Figure 18 – Modulation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique par un probiotique
L'exposition au probiotique Lactobacillus rhamnosus durant la période embryonnaire et jusqu'au sevrage est en capacité de contrer l'augmentation des protéines Claudine-5 et Occludine dans l'hippocampe de souris induite par un traitement à la pénicilline durant la même période. Analyse par Western Blot de la quantité relative des protéines normalisée par la quantité de ß-actine trois semaines après l'arrêt des traitements (n=5 par groupe). D'après Leclercq et al. 2017.

b. Neurotransmission

Comme vu précédemment, le microbiote intestinal est en capacité de produire des neurotransmetteurs dans la lumière intestinale qui vont avoir une action locale. De nombreuses études montrent que ce microbiote intestinal est également en capacité de moduler les taux de GABA, de sérotonine, de catécholamines et de leurs récepteurs au niveau du SNC, modulant ainsi les systèmes de neurotransmission majeurs du cerveau (Mazzoli & Pessione, 2016; Strandwitz, 2018) [Figure 23B].

i. GABA

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Il réduit l'activité neuronale et joue un rôle important dans l'anxiété et la dépression. L'étude du Dr. JA. Bravo et de ses collaborateurs (Bravo et al., 2011) démontre l'implication directe du microbiote intestinal sur le système gabaergique du SNC. En effet l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* chez des souris modifie de manière région-dépendante le taux d'ARNm des récepteurs au GABA. L'ARNm du récepteur GABA-B1b se retrouve augmenté dans les régions corticales pré-limbique et cingulaire, et diminué au niveau de l'hippocampe, l'amygdale et le locus cœruleus. De même, l'ARNm du récepteur GABA-Aα2 se retrouve augmenté dans l'hippocampe et diminué dans le cortex préfrontal et l'amygdale. Une diminution du comportement anxieux et dépressif est également observée chez ces animaux. Le nerf vague est une composante indispensable car ces effets ne sont pas retrouvés chez des souris vagotomisées. Par ailleurs, d'autres chercheurs ont démontré que cette espèce bactérienne, *Lactobacillus rhamnosus,*

augmente la fréquence de l'activité des fibres afférentes de ce nerf (Perez-Burgos et al., 2013). Une seconde étude démontre que la colonisation de souris axéniques avec du microbiote provenant de patients schizophrènes induit une augmentation du taux de GABA au niveau hippocampique et est associée avec le développement de symptômes schizophréniques (Zheng et al., 2019).

ii. 5-HT

La sérotonine est un neurotransmetteur ayant un rôle majeur dans la régulation de divers processus biologiques tels que l'humeur, l'apprentissage, la mémoire, la prise de décision, le sommeil et la digestion. Ne passant pas la BHE, sa production au niveau cérébral est totalement dépendante de la disponibilité de son précurseur, le tryptophane. Cependant, le taux de tryptophane circulant pouvant passer la BHE est modulé par le microbiote intestinal. Ce dernier a un rôle largement décrit dans la production de sérotonine au niveau intestinal, représentant 90% du taux de sérotonine présente dans l'organisme, diminuant ainsi le taux de tryptophane circulant et indirectement la quantité de sérotonine cérébrale.

En effet, des études sur souris axéniques démontrent une augmentation du taux de tryptophane circulant et de sérotonine au niveau cérébral (Clarke et al., 2013; Heijtz et al., 2011), et une diminution du taux de sérotonine circulante reflétant une diminution de la production de sérotonine au niveau intestinal (Wikoff et al., 2009). Par ailleurs, l'administration de *Bifidobacteria infantis* chez des rats augmente le taux de tryptophane circulant (Desbonnet et al., 2010).

Comme décrit précédemment, l'action du microbiote intestinal sur la disponibilité en tryptophane est d'une part dû à un effet direct *via* le métabolisme du tryptophane alimentaire par les bactéries intestinales (Taleb, 2019), et d'autre part dû à un effet indirect *via* le métabolisme du tryptophane par l'enzyme Tph1 des cellules EC qui est modulée par le microbiote intestinal (Yano et al., 2015).

iii. Catécholamines

Les catécholamines correspondent à la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline. Elles sont impliquées dans le système de récompense et ont un rôle dans la prise de décision, la motivation, l'attention, la mémoire et les états d'alertes. Le microbiote intestinal est en capacité d'altérer le taux cérébral de catécholamines ainsi que l'expression de leurs

récepteurs. En effet, chez des souris axéniques on observe une augmentation du taux de dopamine et noradrénaline dans le striatum et une diminution de l'expression des récepteurs D1 dans le gyrus denté (Heijtz et al., 2011). De même, une déplétion bactérienne par traitement antibiotique chez des souris entraîne une exacerbation des réponses comportementales lors d'une administration de cocaïne et une augmentation du taux de récepteurs D1 dans le noyau accumbens (Kiraly et al., 2016). Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'espèce bactérienne *Enterococcus faecalis* produit de la L-Dopa, le précurseur des catécholamines, qui est en capacité de passer la BHE (Y. Wang et al., 2021).

Il est important de noter que la plus grande partie des recherches étudiant le microbiote intestinal et les systèmes de neurotransmission cérébrale s'est principalement intéressée aux systèmes gabaergiques, sérotoninergiques et catécholaminergiques. Néanmoins, l'ensemble des systèmes de neurotransmission semblent modulés par le microbiote intestinal.

c. Facteurs neurotrophiques

i. Qui sont-ils ?

Les facteurs neurotrophiques constituent une grande famille de protéines impliquées dans la différenciation, la croissance et la survie neuronale. Ils sont subdivisés en trois sous-familles : les neurotrophines, les facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales ou GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) et les facteurs neurotrophiques ciliaires ou CTF (*ciliary neurotrophic factor*).

Le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), faisant partie des neurotrophines, est le facteur neurotrophique le plus abondant dans le SNC. Il est synthétisé suite à l'activation des facteurs de transcription CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) et NF-κB et il va se fixer avec une haute spécificité sur le récepteur TrkB (*Tropomycin receptor kinase B*) et avec une affinité moindre sur le récepteur p75NTR (*p75 neurotrophin receptor*) (Reichardt, 2006). Il est largement étudié de par son rôle majeur dans la plasticité synaptique et la cognition (Balaratnasingam & Janca, 2012; Lipsky & Marini, 2007). L'étude de modèles de souris hétérozygotes ou knock-out conditionnels pour le gène du BDNF montre une altération de la mémoire, du comportement aversif, de la potentialisation à long terme, de la neurogenèse et de la survie neuronale (Baquet et al., 2004; Heldt et al., 2007; J. Lee et al., 2002; Monteggia et al., 2004).

ii. Le BDNF et le microbiote intestinal

De nombreuses études montrent que le microbiote intestinal est en capacité de moduler l'expression des facteurs neurotrophiques, notamment le BDNF [Figure 19 & 22C].

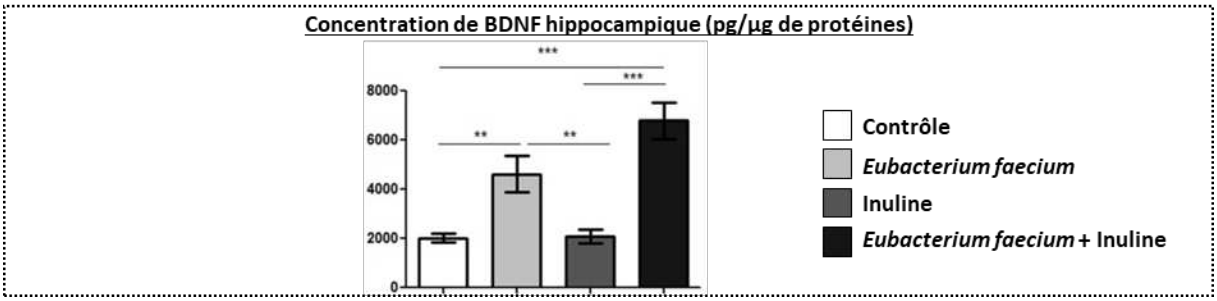


Figure 19 – Modulation du BDNF hippocampique par un symbiotique

L'administration quotidienne par gavage durant cinq semaines d'un symbiotique composé du prébiotique Inuline (860 mg/kg) et du probiotique Eubacterium faecium (4×10^8 CFU) augmente davantage la concentration de BDNF hippocampique chez des rats Sprague-Dawley par comparaison au probiotique seul. Dosage par ELISA (n = 8 par groupes). D'après Romo-Araiza et al. 2018.

De manière générale, un microbiote intestinal diversifié a un effet positif sur le taux de BDNF. En effet, il est augmenté au niveau cérébral, et plus particulièrement au niveau hippocampique, suite à l'administration de symbiotiques, de probiotiques tels que *Lactobacillus helveticus NS8* et *Lactobacillus johnsonii CJLJ103*, de butyrate de sodium ou encore de quercétine, un flavonoïde connu pour son effet bénéfique sur la flore intestinale (Heyck & Ibarra, 2019; H. J. Lee et al., 2018; Liang et al., 2015; Menglian et al., 2018; Varela et al., 2015) L'absence de microbiote chez des souris axéniques ou sa déplétion *via* un traitement antibiotique entraîne une diminution du taux de BDNF qui peut être reversée par une transplantation de microbiote fécal (Bercik et al., 2011), mais également une diminution de l'expression de son récepteur TrkB au niveau hippocampique ainsi qu'une altération de la neurogenèse (Bistoletti et al., 2019; Heijtz et al., 2011; Möhle et al., 2016; Scott et al., 2020)**.** Le microbiote intestinal a également une influence sur le facteur de transcription CREB qui contrôle la synthèse de BDNF. Ainsi, une absence de microbiote chez des souris dès la naissance induit une diminution de l'expression de CREB qui peut être restaurée suite à une colonisation microbienne à l'adolescence (Zeng et al., 2016). L'administration *de Lactobacillus johnsonii CJLJ103* augmente l'expression de CREB au niveau hippocampique (H. J. Lee et al., 2018).

d. Cellules gliales

Les cellules gliales cérébrales ont une fonction de soutien et de protection des réseaux neuronaux. Il existe différents types de cellules gliales qui distinguent par une morphologie et des fonctions bien définies permettant le bon fonctionnement cérébral.

i. Microglies et microbiote intestinal

Les microglies représentent environ 10% des cellules du cerveau et correspondent aux cellules immunitaires cérébrales. Dans leur état dit quiescent, chaque cellule microgliale scanne son propre territoire par des mouvements rapides de ses longs prolongements dendritiques. En cas de lésion cérébrale ou en présence de pathogènes, les microglies vont s'activer, proliférer, adopter une forme amiboïde avec un raccourcissement de leurs prolongements dendritiques et une augmentation du volume de leur corps cellulaire, et subir un changement fonctionnel les menant à un phénotype pro-inflammatoire (Boche et al., 2013; Nimmerjahn et al., 2005). Elles ont également un rôle important dans le développement des circuits neuronaux *via* leur implication dans la plasticité synaptique, la régulation de la mort neuronale et la neurogenèse (Audinat & Arnoux, 2014; Diaz-Aparicio et al., 2020; Marín-Teva et al., 2012).

Les travaux de recherche du Dr. D. Erny et ses collaborateurs (Erny et al., 2015) ont permis de mettre en avant l'implication du microbiote intestinal dans la maturation et la fonction de ces cellules microgliales [Figure 20 & 23D_1]. L'analyse de ces dernières dans des souris axéniques a mis en évidence une altération de leur profil d'expression génétique, notamment des gènes liés à l'activation cellulaire, et un défaut de maturation. Elles présentent une morphologie altérée avec une augmentation du nombre et de la longueur de leurs prolongements dendritiques, et scannent l'environnement des microglies voisines reflétant un défaut du réseau microglial. D'un point de vue fonctionnel, l'absence de micro-organismes diminue leur réponse pro-inflammatoire suite à une infection virale ou l'administration de LPS. Une transplantation de microbiote fécal ou une administration d'AGCC chez ces souris axéniques restaure une partie des défauts morphologies. Des études plus récentes montrent qu'une absence de microbiote dès la naissance entraîne une altération des cellules microgliales à l'âge adulte (Thion et al., 2018) et que le probiotique *Lactobacillus johnsonii CJLJ103* est inhibe la voie NF-κB dans des cultures microgliales (H. J. Lee et al., 2018).

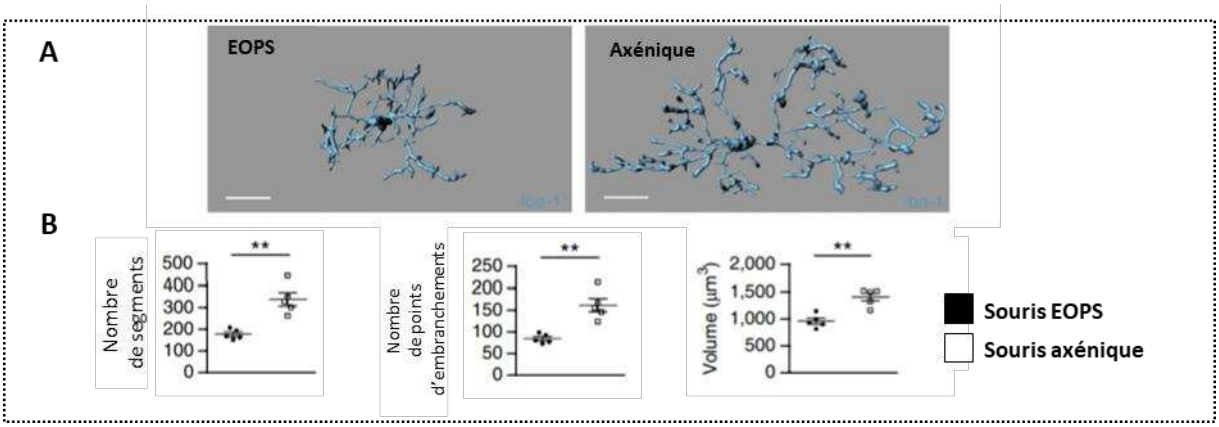


Figure 20 – L'absence de microbiote impacte la morphologie des cellules microgliales

L'absence de microbiote chez des souris axéniques en comparaison à des souris EOPS altère la morphologie des cellules microgliales. Reconstruction tridimensionnelle d'une cellule microgliale (A) Barre d'échelle : 15µm. Quantification du nombre de segments, de points d'embranchements et du volume des cellules microgliales corticales (B). D'après Erny et al. 2015. EOPS : exempt d'organisme pathogène spécifique.

ii. Astrocytes et microbiote intestinal

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes du SNC. On distingue deux types d'astrocytes selon leur morphologie : les astrocytes protoplasmiques qui possèdent de nombreuses extensions dendritiques épaisses et les astrocytes fibreux, présents principalement au niveau de la matière blanche, qui possèdent des prolongements dendritiques plus longs et fins (Tabata, 2015). D'un point de vue fonctionnel, ces cellules participent au maintien de la BHE, à la synaptogenèse et constituent un support neuronal important, notamment *via* le recyclage du glutamate (Baldwin & Eroglu, 2017; C. Y. Liu et al., 2018; Mahmoud et al., 2019). Elles assistent également les cellules microgliales dans leur rôle de défense immunitaire cérébrale. En présence de pathogène, les astrocytes deviennent réactifs et vont proliférer, sécréter de nombreuses molécules pro- et anti-inflammatoires et acquérir une activité phagocytaire (Liddelow & Barres, 2017).

Cette fonction immunitaire astrocytaire est modulée par le microbiote intestinal, notamment via le facteur de transcription AhR [Figures 21 et 23D_2]. Les recherches du Dr. V. Rothhammer et de ses collaborateurs constituent les principales démonstrations impliquant AhR comme un médiateur important entre le microbiote intestinal et l'activation des cellules astrocytaires. Comme décrit précédemment, le métabolisme du tryptophane alimentaire par le microbiote intestinal libère des activateurs de ce facteur de transcription : l'indole-3-sulfate, l'indole-3-aldéhyde et l'acide indole-3-propionique (Hubbard et al., 2015). Leur administration dans des souris traitées aux antibiotiques module l'activation des astrocytes vers un phénotype anti-inflammatoire (Rothhammer et al., 2016).

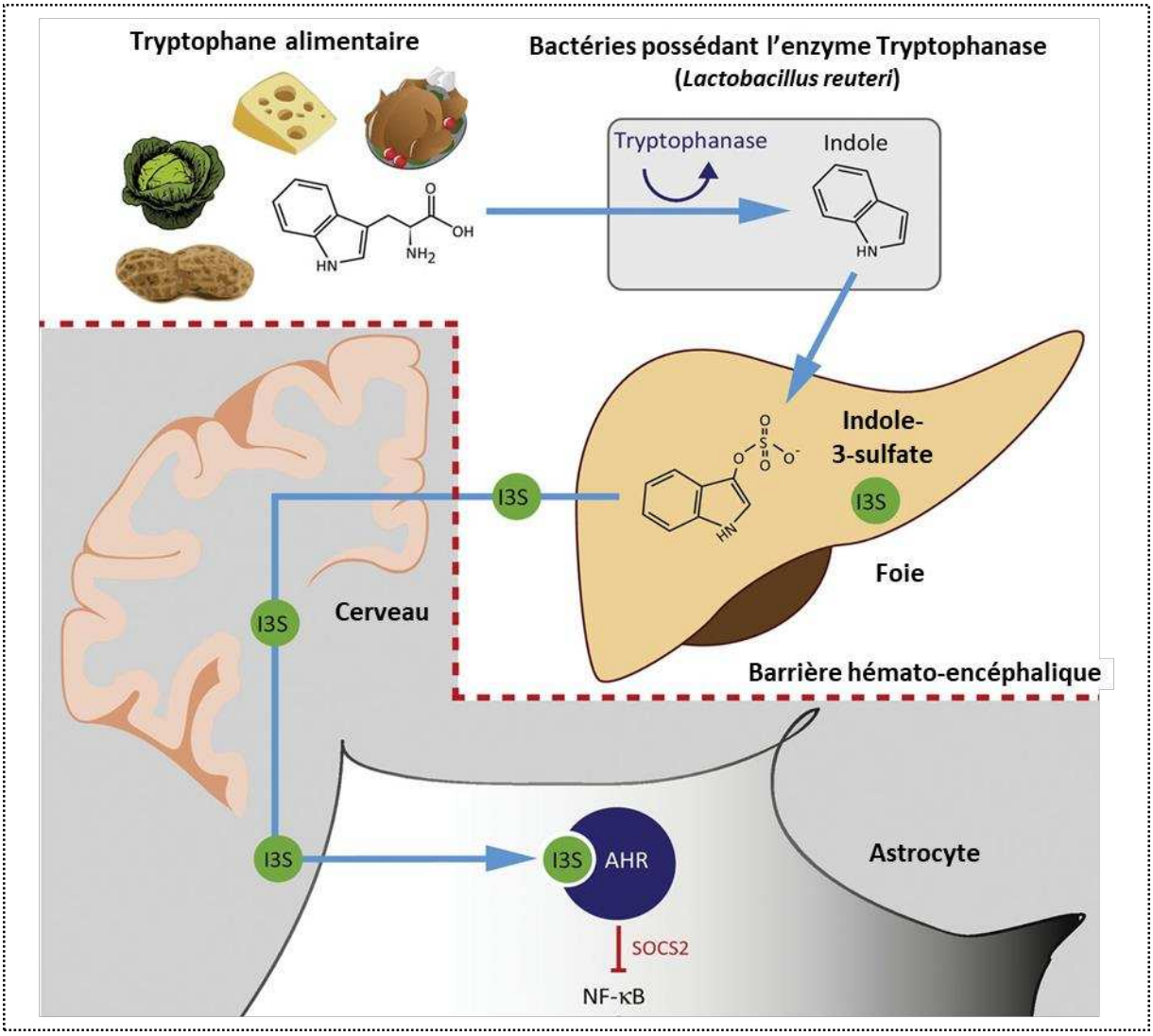


Figure 21 - Les métabolites du tryptophane alimentaire contrôlent l'inflammation via les récepteurs AhR
Représentation schématique du tryptophane alimentaire décomposé en indole par des bactéries intestinales positives à la tryptophanase, puis métabolisé en Indoxyl-3-sulfate et d'autres métabolites dans le foie et libéré dans la circulation sanguine. Ces dérivés d'indole sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et se lier au récepteur AHR astrocytaire induisant l'inhibition de la voie inhiber l'activation et la translocation nucléaire de NF-κB et ainsi l'inflammation.
D'après Rothhammer and Quintana 2016. I3S : Indole-3-sulfate. AHR : Aryl hydrocarbon receptor. SOCS2 : Suppressor Of Cytokine Signaling 2.

Les métabolites bactériens du tryptophane peuvent également moduler l'activation des cellules astrocytaires *via* un mécanisme impliquant les cellules microgliales. Ils induisent la production de VEGF-B (*Vascular endothelial growth factor B*) et de TGFα (*Transforming growth factor α*) par les microglies qui vont respectivement réguler positivement et négativement l'activation astrocytaire (Rothhammer et al., 2018). D'autres études ont montré qu'une transplantation de microbiote provenant de souris déficientes pour le gène NLRP3 permet d'améliorer significativement les défauts astrocytaires observés dans un modèle de stress chronique imprévisible chez la souris C57BL/6 (Y. Zhang et al., 2019).

iii. Oligodendrocytes et microbiote intestinal

Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC [Figure 22 & 23D_3]. Leurs prolongements s'enroulent autour de plusieurs fibres nerveuses et forment ce que l'on appelle la gaine de myéline qui participe activement à la transduction du signal nerveux. Au niveau du SNP, cette fonction est assurée par les cellules de Schwann.

Un déficit dans la maturation des oligodendrocytes est observé chez les enfants nés prématurément et est généralement associé avec le développement de lésions cérébrales de la substance blanche et d'altérations cognitives, en particulier des déficits d'attention et des difficultés sociales (Back et al., 2001; Bhutta et al., 2002; Buser et al., 2012; Healy et al., 2013). Parallèlement, les enfants prématurés présentent une dysbiose du microbiote intestinal avec une diminution du taux d'AGCC, une diminution de la diversité bactérienne, une augmentation des bactéries anaérobiques telles que le genre *Staphylococcus* et une absence, dans la majorité des cas, du genre *Bifidobacterium* (Arboleya et al., 2012; Dahl et al., 2018; Jacquot et al., 2011). Bien que la composition du microbiote intestinal devienne similaire de celle des enfants nés à terme après quelques semaines, la dysbiose initiale semble responsable des altérations de myélinisation. L'étude de souris humanisés avec du microbiote fécal provenant d'enfants nés prématurément induit une diminution du taux de MBP (*myelin basic protein*), protéine majoritairement présente dans la myéline et essentielle aux processus de myélinisation (Lu et al., 2018). Cette altération semble médiée par la diminution du facteur de croissance IGF-1 (*insulin growth factor*) dont l'expression est dépendante du microbiote intestinal (Beck et al., 1995; J. Yan & Charles, 2018). Par ailleurs, l'administration d'antibiotique à des souris NOD (*non-obese diabetic*) de souche C57BL/6, un modèle murin de diabète présentant des défauts de myélinisation, est en capacité de restaurer le taux de protéines composant la myéline dans le cortex préfrontal (Gacias et al., 2016). Dans cette même étude, une analyse métabolomique du contenu intestinal de souris saines colonisées avec le microbiote fécal de souris NOD a montré une augmentation du taux de crésol qui est en capacité d'inhiber la maturation des progéniteurs d'oligodendrocytes *in vitro*.

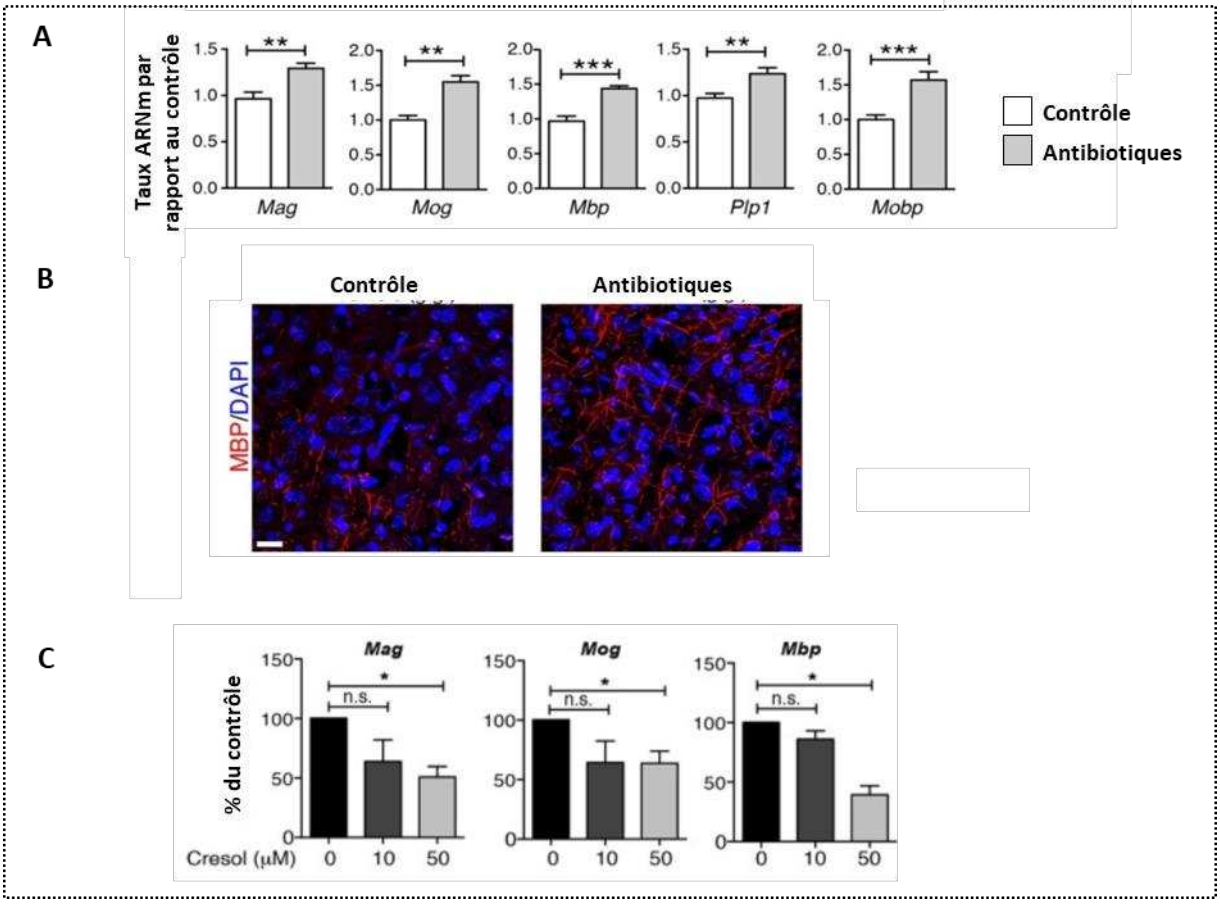


Figure 22 – Modulation des protéines de la myéline par traitement antibiotique et métabolite bactérien
Un traitement antibiotique quotidien (vancomycine 50 mg/kg, néomycine 100 mg/kg, métronidazole 100 mg/kg et amphotéricine B 1 mg/kg, ampicilline 1mg/kg) durant deux semaines augmente l'expression des protéines composant la myéline dans des souris NOD. Quantification du taux d'ARNm par qPCR des protéines composant la myéline (A) et analyses en microscopie confocale de la myéline au niveau du cortex préfrontal (B) (n= 3 par groupes). Barre d'échelle : 50µm. Le métabolite bactérien Crésol diminue de manière dose dépendante le taux des protéines composant la myéline dans des cultures de progéniteurs d'oligodendrocytes (C) (n=3 par condition). D'après Gacias et al. 2016. Mag : Myelin-associated glycoprotein. Mog : Myelin oligodendrocyte glycoprotein. Mbp : Myelin basic protein. Plp1 : Proteolipid protein 1. Mobp : Myelin-associated oligodendrocyte basic protein.

iv. Ependymocytes et microbiote intestinal

Les épendymocytes sont le quatrième type de cellules gliales retrouvé dans le SNC. Ils tapissent la paroi du canal épendymaire de la moelle épinière et des ventricules cérébraux formant une barrière entre le cerveau et le LCS (liquide cérébrospinal). Les épendymocytes participent à la production et à la circulation du LCS qui permet de protéger le cerveau, de réguler l'homéostasie cérébrale et d'éliminer les déchets cérébraux (Telano & Baker, 2018).

A ce jour, aucune étude ne démontre un effet direct du microbiote intestinal sur ces cellules épendymaires cérébrales. Cependant, des analyses de la composition du LCS humain montrent la présence d'un métabolite intestinal, la TMAO (*Trimethylamine-N-oxide*) (Rio et al.,

2017) et l'augmentation d'IgG dirigés contre la bactérie intestinale *Akkermansia muciniphila* chez des patients atteints de sclérose en plaques (Vallino et al., 2020).

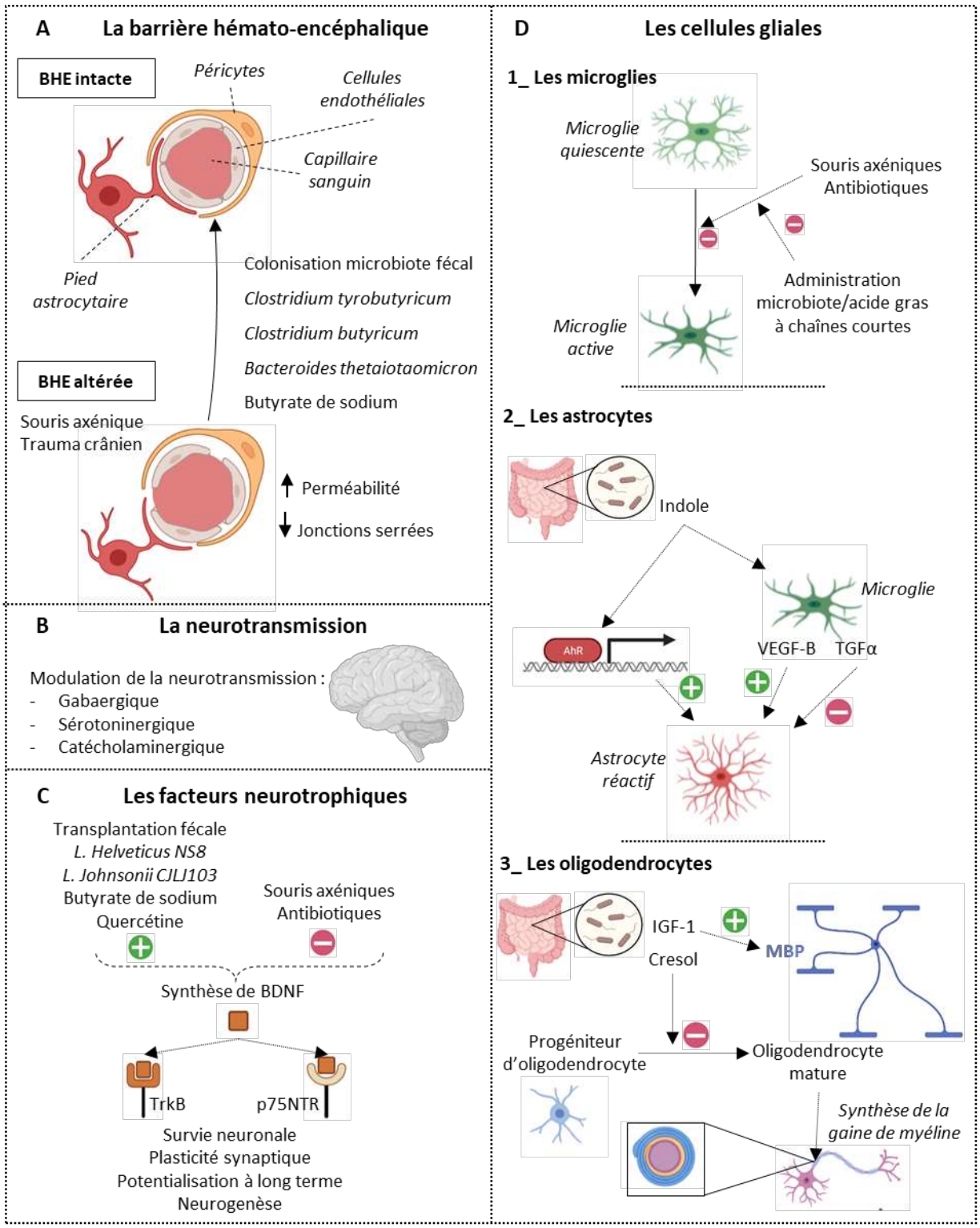


Figure 23 – L'influence du microbiote intestinal sur l'homéostasie cérébrale

Représentation schématique de l'influence du microbiote intestinal sur l'homéostasie cérébrale via son action sur la barrière hémato-encéphalique (A), les systèmes de neurotransmission (B), les facteurs neurotrophiques (C) et les cellules gliales cérébrales (D).

3. Microbiote intestinal et désordres cérébraux

Du fait de l'influence du microbiote intestinal sur l'homéostasie cérébrale, sa contribution dans les désordres cérébraux, longtemps ignorée, est maintenant prise en compte et a constitué l'objet de nombreuses recherches au cours de ces dernières années. L'étude de patients et de modèles précliniques et a permis de mettre en évidence qu'une dysbiose du microbiote intestinal est impliquée de manière non-négligeable dans le développement et le maintien de nombreuses pathologies cérébrales.

a. Maladies psychiatriques

i. Caractéristiques générales

Dépression

Le syndrome de dépression majeur est le trouble de l'humeur le plus répandu. Le diagnostic est posé lorsque le patient présente au moins cinq des symptômes cliniques présentés dans le DSM-V durant un minimum de deux semaines tels qu'une perte d'appétit, une irritabilité, une perturbation du sommeil, une perte d'énergie ou encore un trouble de l'attention (American Psychiatric Association, 2013). La majorité des patients dépressifs présentent un dysfonctionnement de l'axe HHS (hypothalamo-hypophyso-surrénalien), un système neuroendocrine impliqué dans les réponses au stress [Figure 24] (Smith & Vale, 2006). Une suractivation de cet axe est observée avec une augmentation du taux de cortisol et de corticolibérine (ou CRH - *corticotroprin releasing hormone*), une inefficacité du test de suppression à la dexaméthasone - un cortisol de synthèse permettant d'inhiber l'axe HHS - et une diminution du taux d'adrénocorticotrophine (ou ACTH - *adreno corticotropic hormone*) consécutive à l'administration de CRH (Varghese & Brown, 2001).

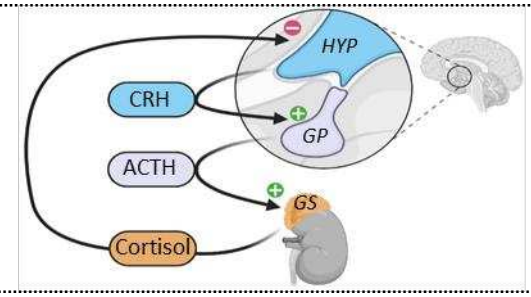


Figure 24 – L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Schéma représentant la boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. HYP : hypothalamus. GP : glande pituitaire. GS : glande surrénale. CRH : corticolibérine. ACTH : adrénocorticotrophine.

Schizophrénie

La schizophrénie est une maladie psychiatrique caractérisée par des symptômes positifs tels que des idées délirantes, des hallucinations et un discours désorganisé, et par des symptômes négatifs tels qu'une apathie, un retrait social et une diminution de l'expressivité et enfin par des déficits cognitifs tels que des déficits mnésiques et une inaptitude à résoudre des problèmes (American Psychiatric Association, 2013).

Troubles du spectre de l'autisme

Les TSA (troubles du spectre de l'autisme) englobent le trouble de l'autisme, le syndrome d'Asperger et le trouble envahissant du développement non-spécifique. Les personnes atteintes de TSA présentent une difficulté de communication et d'interaction, des centres d'intérêt restreints et des comportements répétitifs. L'ensemble de leurs symptômes entraîne des difficultés scolaires, professionnelles et sociales dans la vie quotidienne (American Psychiatric Association, 2013).

ii. Maladies psychiatriques et microbiote intestinal chez le rongeur

Preuves de concept

L'étude de souris axéniques a permis de mettre en évidence l'implication du microbiote intestinal dans la régulation de l'axe HHS et la dépression. En effet, suite à l'exposition à un stress chronique, des souris axéniques présentent une réponse hormonale exacerbée avec une augmentation du taux de corticostérone - l'équivalent du cortisol chez les humains – de CRH et d'ACTH plasmatique et hypothalamique (Huo et al., 2017; Sudo et al., 2004). De plus, l'administration de probiotiques du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* est en capacité de corriger ces dérégulations (Gareau et al., 2007; Savignac et al., 2014; Sudo et al., 2004). Par ailleurs, la stimulation du nerf vague, qui rappelons-le, est l'une des voies principales de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau, diminue la suractivation de l'axe HHS et améliore les symptômes dépressifs (O'Keane et al., 2005).

Dans le cadre des troubles du spectre de l'autisme, le modèle murin d'activation du système immunitaire maternel (ou MIA - *maternal immune activation*), a permis de mettre en évidence l'implication du microbiote intestinal dans ce trouble. Ce modèle consiste à administrer à une femelle gestante un ARN double brin synthétique, l'acide polyI:C (polyinosinique-polycytidylique), mimant une infection virale. L'exposition *in utero* à l'activation du système

immunitaire de la mère engendre dans la descendance des altérations de communication, des comportements répétitifs et une augmentation de la perméabilité intestinale (Hsiao et al., 2013; W. Li et al., 2021). Le Dr. E. Hsiao et ses collaborateurs ont montré que ces différentes altérations peuvent être corrigées par l'administration de l'espèce bactérienne *Bacteroides fragilis* (Hsiao et al., 2013). Dans cette même étude, ils ont montré que ce modèle murin de souche C57BL/6N présente une élévation du taux de 4-EPS (4-ethylphenylsulfate), un métabolite bactérien, qui peut être normalisée par l'administration de *Bacteroides fragilis*. Par ailleurs, ce métabolite est suffisant à lui seul pour entraîner des défauts comportementaux chez des souris saines [Figure 25]. Plus récemment, il a été découvert que l'administration de l'espèce *Lactobacillus reuteri* dans différents modèles murins C57BL/6J de TSA restaure les déficits de sociabilité par un mécanisme dépendant du nerf vague (Sgritta et al., 2019).

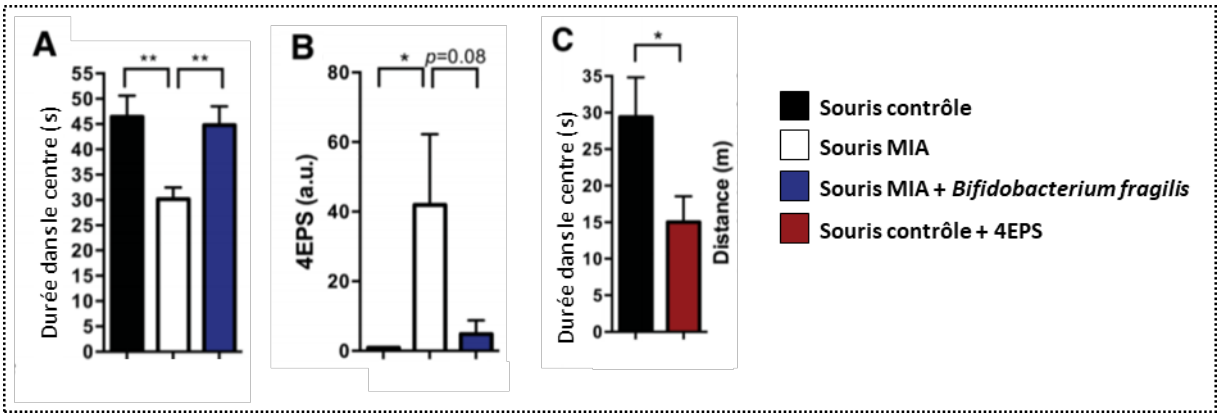


Figure 25 – Impact du microbiote intestinal dans les troubles du spectre autistique chez la souris
L'administration du probiotique Bifidobacterium fragilis (1×10^{10} CFU) dans la nourriture permet de prévenir chez les souris MIA (modèle du trouble du spectre autistique) les troubles anxieux et l'augmentation du taux de 4-EPS, un métabolite induisant à lui seul un comportement anxieux. Analyse du temps passé dans le centre d'une arène (A, C) (n=8-10 par groupe) et dosage par LC-MS du 4-EPS dans le sérum (B) (n=5 par groupe).
D'après Hsiao et al. 2013. 4-EPS : 4-ethylphenylsulfate. MIA : Maternal immune activation.

Humanisation

L'humanisation de rongeurs avec le microbiote fécal de patients atteints de troubles psychiatriques a mis en avant le rôle causal de la dysbiose intestinale présente chez les patients dans le développement de tels troubles. En effet, dans deux études indépendantes, l'humanisation de rongeurs avec du microbiote fécal de patients atteints de dépression sévère entraîne le développement de symptômes dépressifs chez les animaux, dans les tests de la nage forcée, de suspension par la queue, de préférence au sucrose et dans l'activité spontanée en *open-field* (Kelly et al., 2016; Zheng et al., 2016) [Figure 26]. De même, l'humanisation de souris avec du microbiote fécal provenant de patients atteints de schizophrénie ou l'administration de l'espèce *Streptoccocus vestibularis*, dont l'abondance est augmentée chez les patients,

entraîne un ensemble de symptômes pouvant refléter un comportement schizophrénique tel qu'une hyperactivité, une réponse exacerbée dans le test de l'inhibition de l'impulsion (ou *PPI - pre-pulse inhibition*) ou encore un déficit de préférence sociale et de sociabilité (Zheng et al., 2019; Zhu et al., 2020). Enfin, le microbiote fécal, provenant d'enfants présentant un TSA, induit chez des souris axéniques le développement de comportements répétitifs, de déficits de communication et une dérégulation de l'expression de gènes au niveau du cortex préfrontal et du striatum, gènes que l'on retrouve également dérégulés chez des enfants atteints de TSA (Sharon et al., 2019).

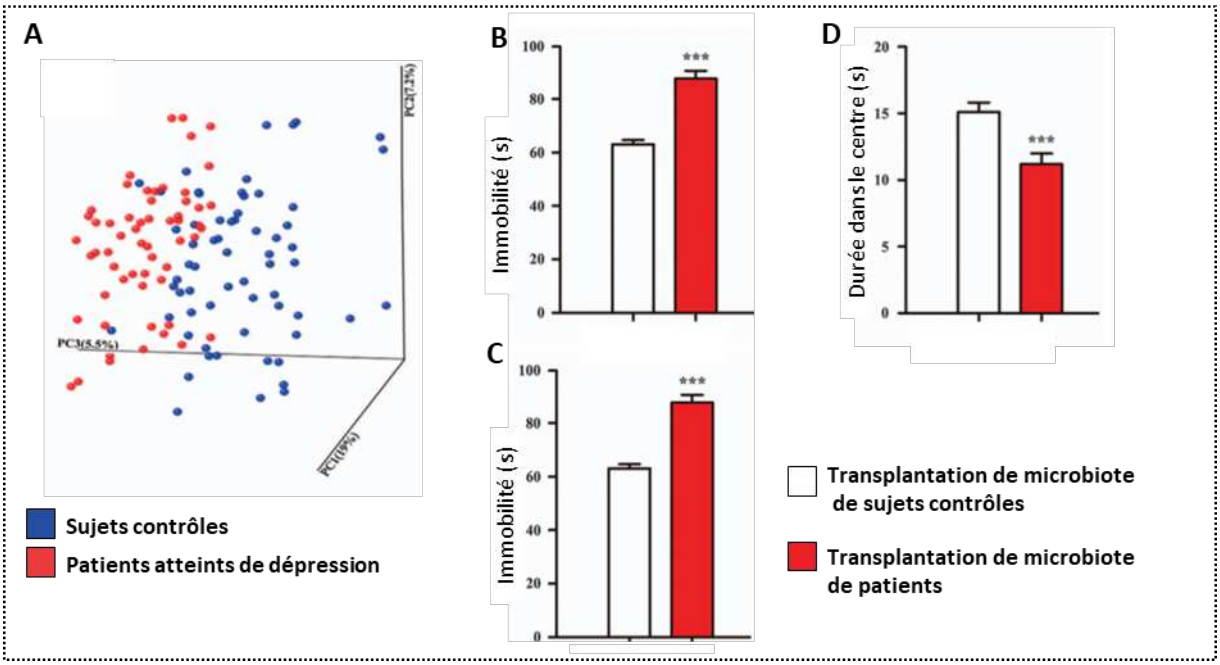


Figure 26 – Humanisation de rongeurs avec du microbiote de patients atteints de dépression
La transplantation de microbiote fécal de patients atteints de dépression sévère induit des symptômes dépressifs chez des souris axéniques. Analyse en composantes principales (UniFrac) de la composition bactérienne de sujets contrôles et patients atteints de dépression sévère (n=58-63 par groupe) (A). Analyse du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée (B), de la suspension par la queue (C) et du temps passé dans le centre d'une arène (D) chez les souris après transplantation de microbiote fécal. D'après Zheng et al. 2016.

iii. Maladies psychiatriques et microbiote intestinal en clinique humaine

Caractérisation de la dysbiose intestinale

L'analyse du microbiote intestinal chez les patients atteints de dépression (Jiang et al., 2015; Kelly et al., 2016; P. Lin et al., 2017; Naseribafrouei et al., 2014; Zheng et al., 2016), de schizophrénie (Y. He et al., 2018; Nguyen et al., 2019; Schwarz et al., 2018; Shen et al., 2018; Zhu et al., 2020) et de troubles du spectre de l'autisme (Alshammari et al., 2020; De Angelis et al., 2013; Strati et al., 2017; R. H. Zhao et al., 2019) a permis de mettre en évidence la présence d'une dysbiose intestinale

par comparaison à des sujets sains. Ces altérations sont résumées de manière non-exhaustive dans le tableau 4.

Brièvement, de nombreux genres bactériens sont modulés de manière similaire dans différentes études : les patients atteints de dépression sévère présentent une augmentation des *Alistipes*, *Lachnospiraceae-incarae sedis*, *Phascolarctobacterium*, *Oscillibacter* et *Roseburia*, et une diminution des *Dialister* ; les patients atteints de schizophrénie présentent une augmentation des *Lactobacillus* et *Prevotella* ; et les patients atteints de TSA une augmentation des *Barnesialla*, *Clostridium* et *Roseburia*, et une diminution des *Dialister*, *Faecalibacterium* et *Streptococcus*. Par ailleurs, de nombreux genres bactériens sont modulés, de manière similaire ou contradictoire, dans au moins deux des troubles décrits : *Alistipes*, *Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Faecalibacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Megamonas*, *Megasphaera*, *Parabacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* et *Streptoccocus*. L'espèce bactérienne *Akkermansia muciniphila*, connue pour moduler le métabolisme et plus récemment étudiée pour être administrée comme probiotique, (Ashrafian et al., 2021; Xu, Wang, et al., 2020), se retrouve augmentée chez les patients atteints de schizophrénie et de TSA. Cependant, l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) dans son rapport du 2 juillet 2020 ne recommande pas l'administration d'*A. muciniphila* vivante, en tant que probiotique, pour des problèmes de sécurité alimentaire. En revanche, dans une publication du 1er septembre 2021, l'EFSA considère que l'ingestion de 3.,4 10^{10} cellules/jours d'*A. muciniphila* pasteurisée (donc non-vivante) est sans risque pour la population cible (à l'exclusion des femmes enceintes et allaitantes) et peut donc être utilisée comme supplément alimentaire.

Cette dysbiose intestinale ne se cantonne pas seulement aux abondances bactériennes. En effet, les patients schizophrènes présentent une augmentation du taux d'anticorps dirigés contre le parasite *Toxoplasma gondii*. Ce dernier est également connu pour augmenter le risque de développer un trouble schizophrénique, appelé toxoplasmose congénitale, lorsqu'il infecte le fœtus (Mortensen et al., 2007). Le champignon *Candida Albicans* est également impliqué dans le développement de tels troubles. Une séropositivité pour ce champignon est associée à une plus grande susceptibilité de diagnostic de trouble schizophrénique ou de TSA (Hughes & Ashwood, 2018; Severance et al., 2016).

	Dépression	Schizophrénie	TSA
Phylum	Actinobacteria **Bacteroidetes*** **Firmicutes*** Proteobacteria*	Proteobacteria*	Proteobacteria*
	Bacteroidetes* **Firmicutes***	Proteobacteria*	Bacteroidetes* Firmicutes*
Famille	*Enterobacteriaceae Thermoanaero-bacteriaceae*	*Brucellaceae Halothiobacillaceae Lactobacillaceae Micrococcineae*	
	***Lachnospiraceae** Ruminococcaceae Prevotellaceae*	*Veillonellaceae*	
Genre	***Alistipes**** *Anaerofilum Blautia* Clostridium*-XI/XIVa/XIX Coprococcus* Eggerthella Faecalibacterium* Gelria Holdemania Klebsiella* **Lachnospiracea–incertae sedis** **Megamonas**** *Parabacteroides* Paraprevotella Parasutterella* **Phascolarctobacterium*** *Prevotella** **Oscillibacter** **Roseburia**** *Streptococcus* Turicibacte*	*Acidaminococcus Anaerococcus Citrobacter Clostridium* Collinsella* Deferribacter Desulfovibrio Fusobacterium Halorubrum Halothiobacillus Klebsiella* **Lactobacillus*** Megasphaera* Methanobrevibacter Phascolarctobacterium* **Prevotella**** *Ochrobactrum Saccharophagus Succinivibrio Tropheryma*	*Barnesiella Caloramator Clostridium* Collinsella* Corynebacterium Dorea Lactobacillus* Megamonas* Megasphaera* Roseburia* Sarcina*
	*Bacteroides **Dialister**** *Faecalibacterium **Prevotella**** *Ruminococcus**	*Anabaena Blautia* Coprococcus* Clostridium* Gallionella Haemophilus Nitrosospira Roseburia* Streptococcus* Sutterella*	*Alistipes* Bilophila Dialister* Eubacterium Ezakiella Faecalibacterium* Parabacteroides* Ruminococcus* Streptococcus* Veillonella*
Espèce		*Akkermansia-muciniphila* Alkaliphilus-oremlandii Bacteroides-plebeius Bifidobacterium-adolescentis Bifidobacterium-longum Clostridium-symbiosum Cronobacter-sakazakii Cronobacter-turicensis Enterococcus -faecium Eubacterium-siraeum Streptococcus-vestibularis Veillonella-parvula*	*Akkermansia-muciniphila* Bacteroides-fragilis Clostridium-perfringens Streptococcus-salivarius Streptococcus-thermophilus*

Tableau 4 – Altérations bactériennes du microbiote intestinal dans les maladies psychiatriques

*Ce tableau résume les augmentations (en rouge) et diminutions (en vert) bactériennes intestinales retrouvées chez des patients atteints de troubles psychiatriques par comparaison à des sujets contrôles. Pour une même pathologie, certaines études décrivent des modulations bactériennes contradictoires (soulignées) ou similaires (gras). * bactérie modulée dans différents troubles. TSA : trouble du spectre de l'autisme*

Modulation de la dysbiose intestinale

La dysbiose intestinale ayant un rôle dans le développement des troubles psychiatriques, l'administration de probiotiques, appelés psychobiotiques dans le cadre des maladies psychiatriques (Dinan et al., 2013), et les transplantations de microbiote fécal afin de restaurer le microbiote intestinal ont fait l'objet de traitements alternatifs.

Dans le cadre de la dépression, une transplantation de microbiote fécal chez une femme âgée diagnostiquée avec un trouble dépressif résistant aux anti-dépresseurs, a induit une amélioration de son état en l'espace de deux semaines (Cai et al., 2019). Cette greffe a également conduit à une modification du ratio Firmicutes/Bacteroidetes et à une restauration du taux de *Lachnospiraceae*. Il a également été montré qu'un changement de régime alimentaire peut s'avérer efficace pour traiter la dépression (Firth et al., 2019; Jacka et al., 2017). En ce qui concerne les troubles schizophréniques, l'administration de probiotiques chez des patients améliore leur score dans l'échelle PANSS (*positive and negative syndrome scale*) qui permet de mesurer le degré de sévérité de leurs symptômes (Ghaderi et al., 2019). Enfin, une majorité d'enfants atteints de TSA présente des troubles gastro-intestinaux tels que des constipations chroniques, des diarrhées et des douleurs abdominales (Hsiao, 2014). Ces troubles ainsi que le score CARS (*childhood autistic rating scale*) permettant d'évaluer l'autisme sont améliorés suite à une transplantation de microbiote fécal provenant d'enfants sains (H. Zhao et al., 2019). Les essais cliniques du Dr. D.W. Kang et de ses collaborateurs montrent que ces effets bénéfiques persistent à long terme. En effet, le suivi des patients de leur première étude réalisée en 2017 a montré que l'amélioration des troubles gastrointestinaux et des symptômes autistiques a persisté deux années après la greffe de microbiote fécal (Kang et al., 2017a, 2019a) [Figure 27].

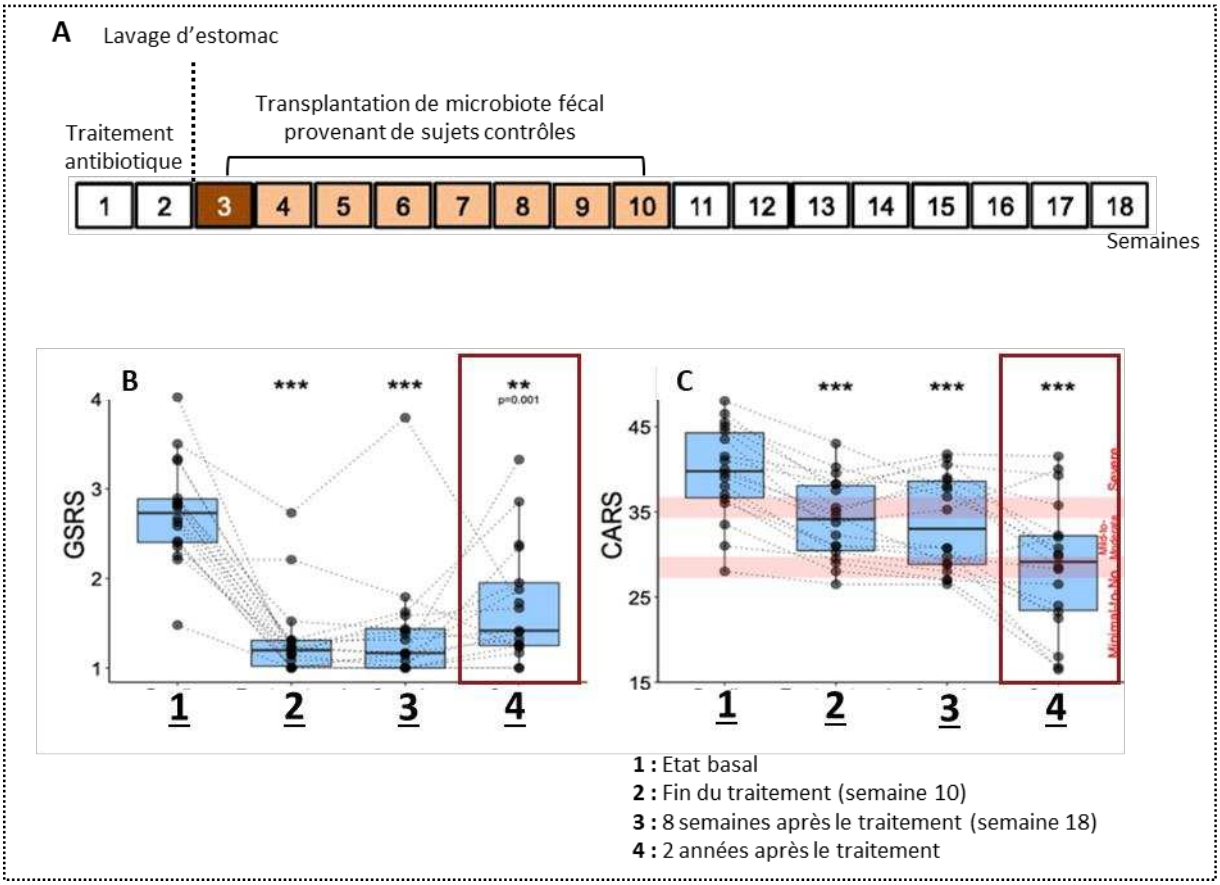


Figure 27 – Transplantation de microbiote fécal chez des enfants atteints de troubles du spectre de l'autisme
Schéma expérimental de l'étude clinique du Dr. DW. Kang et ses collaborateurs consistant à dépléter le microbiote d'enfants atteints de troubles du spectre de l'autisme par traitement antibiotique (vancomycine 40mg/kg), suivi d'un lavage d'estomac (MoviPrep) puis de la transplantation de microbiote fécal par voie orale ou rectale provenant de sujets contrôles (A). Amélioration des scores des troubles gastrointestinaux selon l'échelle GSRS (B) et des troubles autistiques selon l'échelle CARS (C) à moyen et long terme après traitement. D'après Kang et al. 2017, 2019a.GSRS : Gastrointestinal Symptom-Rating Scale. CARS : childhood autistic rating scale.

b. Maladies neurodégénératives

i. Caractéristiques générales

La maladie d'Alzheimer ne sera volontairement pas mentionnée dans cette section étant donné qu'elle sera développée en détail dans la dernière partie de l'introduction.

Sclérose en plaque

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune caractérisée par une démyélinisation des neurones du SNC. Les lymphocytes Th1 et Th17, sécrétant respectivement l'IFNγ et l'IL-17, sont des acteurs majeurs dans le développement de cette pathologie. Une fois activés en périphérie, ils traversent la BHE et vont induire une réaction immunitaire contre les protéines composant la gaine de myéline entraînant ainsi une démyélinisation progressive des neurones du SNC et, à long terme, des troubles cognitifs, visuels, moteurs et sensoriels (Legroux & Arbour,

2015). Le modèle de souris EAE (encéphalomyélite allergique expérimentale) est le principal modèle utilisé pour étudier cette pathologie. Pour l'induire, les souris sont soit immunisées contre les protéines composants la myéline, telles que la MBP ou MOG, soit reçoivent un transfert adoptif de LT spécifiquement réactifs aux protéines de la myéline (Stromnes & Goverman, 2006a, 2006b).

Huntington

La maladie de Huntington, également appelée chorée de Huntington, est une maladie neurodégénérative et héréditaire due à une mutation dominante dans le gène codant pour la protéine Huntingtine. Cette dernière est connue pour son rôle de protéine d'échafaudage, de régulateur transcriptionnel, notamment du gène codant pour le BDNF et pour son rôle dans le transport vésiculaire. La forme mutée de la Huntingtine engendre une mort neuronale, principalement dans le striatum, induisant progressivement l'apparition de déficits moteurs tels que des mouvements involontaires choréiques, des troubles de l'équilibre et de l'élocution mais également des déficits mnésiques (Jimenez-Sanchez et al., 2017). Une perte de poids est également observée chez certains patients et semblerait être un indicateur sur la sévérité de la pathologie. En effet, un haut indice de masse corporel est associé à un développement plus lent des différents symptômes précédemment cités (Van der Burg et al., 2017).

Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la seconde pathologie neurodégénérative la plus répandue et se caractérise par une perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire et par une agrégation cytoplasmique de la protéine α-synucléine. Au niveau clinique, les patients développent progressivement des troubles moteurs tels que des tremblements, une bradykinésie, une hypertonie et des troubles de l'équilibre et de l'élocution (Balestrino & Schapira, 2020). Ils présentent également des troubles gastrointestinaux tels que des constipations, des nausées, des dysphagies et des indigestions (Lubomski et al., 2020). Il a été noté que la constipation, qui est le trouble intestinal le plus fréquent chez ces patients, semble survenir une vingtaine d'années avant l'apparition des symptômes moteurs (Savica et al., 2009). Par ailleurs, des études histologiques montrent la présence d'α-synucléine phosphorylée au niveau du tractus digestif chez 70% des patients (Beach et al., 2010).

Les autopsies de cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson par l'anatomo-pathologiste H. Braak ont permis de démontrer que la pathologie est initiée dans le noyau moteur dorsal du nerf vague et dans le noyau olfactif antérieur, et de diviser la progression de la maladie en six différents stades, appelés stades de Braak (Braak et al., 2003). H. Braak a également posé l'hypothèse que les formes sporadiques de la pathologie pourraient être dues à l'entrée dans l'organisme de pathogènes *via* la cavité nasale qui, après avoir atteint le système digestif, initieraient la pathologie au niveau du SNE pour enfin s'étendre dans le SNC via le nerf vague (Rietdijk et al., 2017).

ii. Maladies neurodégénératives et microbiote intestinal chez le rongeur

Preuves de concept

Le microbiote intestinal étant impliqué dans la régulation des cellules immunitaires intestinales, notamment les Th17 et Treg Foxp3+ (Omenetti & Pizarro, 2015), il fait l'objet de nombreuses études afin de déterminer son implication dans le développement de la sclérose en plaque. Il a été montré que des souris axéniques sont moins enclines à développer une EAE en comparaison à des souris conventionnelles suite à l'injection de MOG, et qu'elles présentent une augmentation du taux de Treg Foxp3+ (Y. K. Lee et al., 2011). Par ailleurs, l'administration de bactéries filamenteuses, déjà connues pour induire la production de Th17 au niveau intestinal (Ivanov et al., 2009), en amont de l'injection de MOG, augmente la susceptibilité des souris axéniques à développer des symptômes d'EAE (encéphalomyélite allergique expérimentale). A l'inverse, l'administration de l'espèce bactérienne *Prevotella histicola* a un effet protecteur (Shahi et al., 2020).

En ce qui concerne la maladie de Huntington, des souris transgéniques modèles R6/1 de souche CBA x C57Bl/6 présentent une dysbiose intestinale avec une augmentation de la diversité bactérienne, une diminution du ratio Firmicutes/Bacteroides, et une augmentation des familles bactériennes *Clostridiales*, *Coriobacteriales*, *Bacteroidales*, *Burkholderiales*, *Erysipelotrichales* et *Lactobacillales* (Kong et al., 2020). Cette dysbiose pourrait expliquer les altérations gastrointestinales et la perte de poids observée (Kong et al., 2020; Van der Burg et al., 2011). Par ailleurs, il a été rapporté que les altérations de myélinisation présentes dans un second modèle de souris transgéniques, BACHD (souris exprimant dans un chromosome artificiel bactérien une huntingtine à 97 répétitions glutamine) de souche FVB, de la maladie sont aggravées en environnement axénique (Radulescu et al., 2019).

Dans le cadre de la maladie de Parkinson, le modèle murin ASO C57BL/6 (*α-synuclein overexpressing*) surexprimant l'α-synucléine humaine, présente des déficits moteurs, une altération de la motilité intestinale et des agrégations de l'α-synucléine dans le SNE et SNC (Chesselet et al., 2012). Le Dr. S. Mazmanian et ses collaborateurs ont montré que des souris ASO axéniques de souche BDF1 ou traitées aux antibiotiques ont un ralentissement du développement de la pathologie en comparaison à des souris conventionnelles (Sampson et al., 2016). Par ailleurs, en environnement axénique, l'administration de microbiote fécal provenant de souris saines conventionnelles ou le traitement avec des AGCC accélèrent le développement de la pathologie en comparaison à des souris ASO axéniques contrôles [Figure 28].

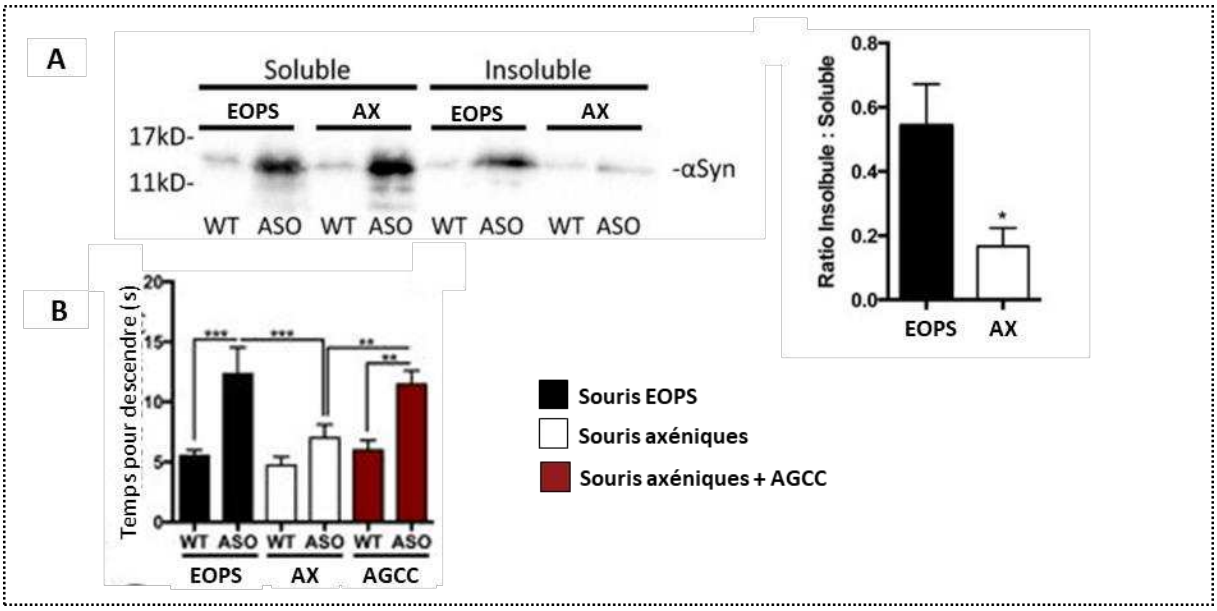


Figure 28 – Impact du microbiote intestinal dans la maladie de Parkinson chez le rongeur

L'environnement axénique chez des souris ASO (modèle transgénique de la maladie de Parkinson surexprimant l'α-synucléine) diminue la pathologie et peut être corrigé par l'administration d'acides gras à chaînes courtes (AGCC). Quantification du ratio d'α-synucléine soluble et insoluble par Western Blot chez des souris saines et ASO en environnement EOPS et axénique (AX) (n=3-4 par groupes) (A). Analyse du temps pour descendre d'une barre chez des souris saines et ASO, en environnement EOPS, axénique, et après traitement avec des AGCC : acétate de sodium (67,5mM), propionate de sodium (25mM) et butyrate de sodium (40mM) durant 6 semaines dans l'eau de boisson (B) (n=6-12 par groupe). D'après Sampson et al. 2016. WT : wild-type. EOPS : exempt d'organismes pathogènes spécifiques.

A l'inverse, en environnement conventionnel, la colonisation de souris modèles de la maladie avec du microbiote de souris saines permet de prévenir les déficits moteurs et a un effet neuroprotecteur (M. F. Sun et al., 2018). Enfin, des études supportent l'hypothèse de Braak qui suggère que la pathologie serait initiée au niveau du SNE et s'étendrait au niveau du SNC *via* le nerf vague. En effet, des pré-fibrilles d'α-synucléine sont observées au niveau du noyau

moteur dorsal du nerf vague puis dans de nombreuses structures telles que le locus cœruleus, l'amygdale ou encore l'hippocampe, suite à leur injection dans le duodénum de souris. Cette propagation est également associée à une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire et au développement de déficits cognitifs. Une vagotomie prévient l'ensemble de ces évènements (S. Kim et al., 2019).

Humanisation

De manière similaire au microbiote de patients atteints de maladie psychiatriques, le microbiote intestinal de patients atteints de sclérose en plaque et de la maladie de Parkinson engendre des altérations neurologiques chez des rongeurs. En effet, l'humanisation de souris saines avec du microbiote de patients atteints de sclérose en plaque augmente leur susceptibilité de développer une EAE suite à l'injection de MOG, et aggrave la pathologie chez des souris transgéniques (Berer et al., 2017; Cekanaviciute et al., 2017). Les travaux de l'équipe du Dr. S. Mazmanian ont montré que l'humanisation de souris axéniques avec du microbiote provenant de patients atteints de la maladie de Parkinson n'affecte pas leurs fonctions motrices. Cependant, l'humanisation de souris ASO axéniques avec ce même microbiote accélère l'apparition des déficits moteurs par comparaison aux souris ASO axéniques ayant reçu du microbiote de patients contrôles (Sampson et al., 2016) [Figure 29].

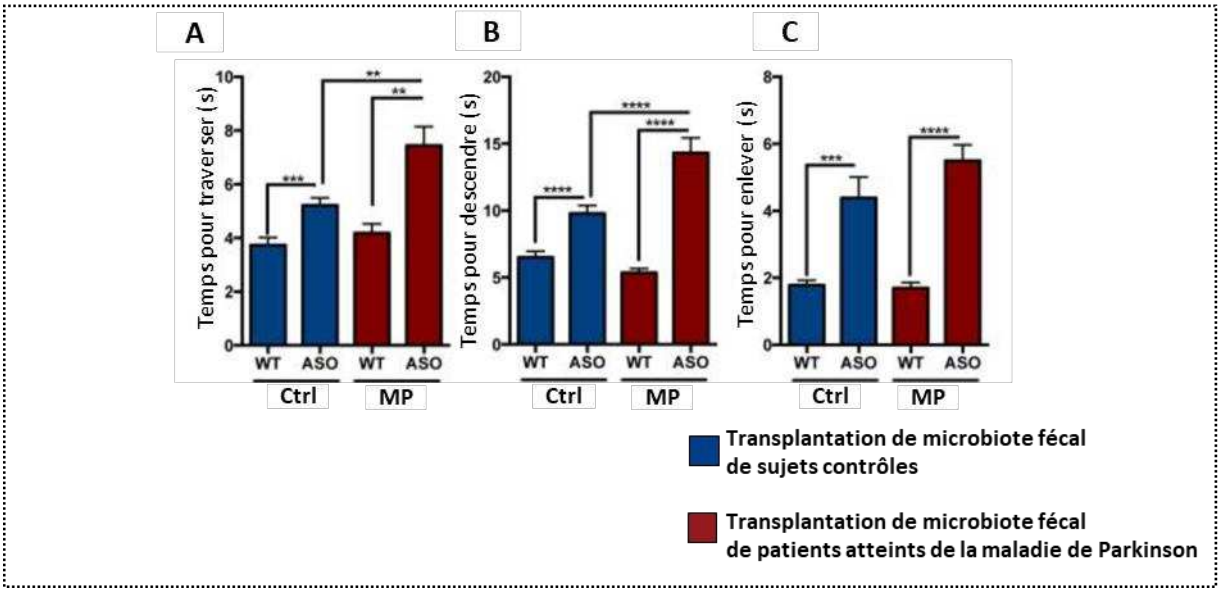


Figure 29 – Humanisation de rongeurs avec du microbiote de patients atteints de la maladie de Parkinson
La transplantation de microbiote fécal de patients atteints de la maladie de Parkinson aggrave les déficits moteurs des souris ASO, modèle transgénique de la maladie de Parkinson. Compilation de l'analyse du temps pour traverser une barre (A), descendre d'une barre (B) et enlever un adhésif du museau (C) chez des souris saines et ASO axéniques après transplantation de microbiote fécal provenant de 6 paires de sujets contrôles ou atteints de la maladie de Parkinson (n=3-6 par groupes). D'après Sampson et al. 2016. WT : wild-type. ASO : surexpression de l'α-synucléine. Ctrl : contrôle. MP : maladie de Parkinson.

iii. Maladies neurodégénératives et microbiote intestinal en clinique humaine

Caractérisation de la dysbiose intestinale

L'analyse du microbiote intestinal chez les patients atteints de sclérose en plaque (Berer et al., 2017; Cantarel et al., 2015; Cekanaviciute et al., 2017; J. Chen et al., 2016; Jangi et al., 2016; Miyake et al., 2015; Tremlett & Waubant, 2018), de la maladie de Huntington (Du et al., 2021) ou encore de maladie de Parkinson (Barichella et al., 2019; Keshavarzian et al., 2015; A. Lin et al., 2018; Scheperjans et al., 2015; Unger et al., 2016; F. Zhang et al., 2020) a permis de mettre en évidence la présence d'une dysbiose intestinale chez les patients par comparaison à des sujets sains appariés en âge et en sexe. Ces altérations sont résumées de manières non-exhaustives dans le tableau 5.

Brièvement, de nombreux genres bactériens sont modulés de manière similaire dans les différentes études : les patients atteints de sclérose en plaque présentent une augmentation du genre *Bifidobacterium* et une diminution des *Faecalibacterium* et *Prevotella* ; et les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une augmentation des *Akkermansia* et *Oscillospira*, et une diminution des *Roseburia*. Par ailleurs, certains genres bactériens se retrouvent modulés de manière similaire ou contradictoire dans au moins deux des troubles neurologiques décrits : *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Dorea*, *Oscillospira* et *Prevotella*. Il est important de noter que l'espèce bactérienne *Akkermansia munciphila* qui est augmentée chez les patients atteints de schizophrénie et de TSA se retrouve également augmentée chez les patients atteints de sclérose en plaque et de la maladie de Parkinson.

Modulation de la dysbiose intestinale

Contrairement aux maladies psychiatriques, peu d'études cliniques ont effectué une modulation du microbiote intestinal en tant que traitement alternatif des maladies neurodégénératives. Pour les patients atteints de la sclérose en plaque, trois patients ayant des troubles gastro-intestinaux ont vu une amélioration de leurs symptômes ainsi que de leur motricité après une transplantation de microbiote fécal provenant de sujets sains (Borody et al., 2011), et les troubles moteurs d'une patiente âgée ont ainsi été stabilisés pendant plus de dix ans (Makkawi et al., 2018). En ce qui concerne la maladie de Parkinson, une greffe fécale chez un homme diagnostiqué depuis sept ans et souffrant de constipation sévère depuis plus de trois ans a permis de restaurer les problèmes de constipation, là où les laxatifs étaient inefficaces, et d'améliorer les tremblements durant deux mois (Huang et al., 2019).

	Sclérose en plaque	Huntington	Parkinson
Phylum	Euryarchaeota Verrucomicrobia	Actinobacteria	Actinobacteria **Bacteroidetes** Firmicutes **Protetobacteria** **Verrucomicrobia**
	Fusobacteria*		Bacteroidetes Euryarchaeota **Firmicutes** Fusobacteria* Tenericutes
Famille		*Desulfovibrionaceae* *Lactobacillaceae** *Oxalobacteraceae*	*Bacteroidaceae** *Bradyrhizobiaceae* *Clostridiaceae* *Clostridia-incertae-sedis-IV* *Enterobacteriaceae* *Lactobacillaeceae** *Ruminococacceae Veillonellaceae* ***Verrucomicrobiaceae***
	*Bacteroidaceae**		*Enterococcaceae* ***Lachnospiraceae*** *Prevotellaceae*
Genre	*Akkermansia** ***Bifidobacterium*** *Blautia** *Desulfovibrio Dorea** *Haemophilus Methanobrevibacter* *Mycoplana Pseudomonas* *Ruminococcus Streptococcus*	*Bilophila Dialister Gemmiger* *Intestinimonas Lactobacillus* *Oscillibacter* Prevotella**	***Akkermansia**** *Bacteroides* ***Oscillospira****
	Adlercreutzia Anaerostipes *Butyricimonas Collinsella* ***Faecalibacterium*** *Parabacteroides* ***Prevotella**** *Slackia*	*Bacteroides* *Clostridium-XVIII*	*Blautia** *Coprococcus Dorea** *Fusobacterium* ***Roseburia*** *Ruminococcus*
Espèce	***Akkermansia-munciphila **** *Acinetobacter-calcoaceticus*		*Akkermansia-munciphila**
	Parabacteroides-distasonis		*Faecalibacterium-prausnitzii*

Tableau 5 – Altérations bactériennes du microbiote intestinal dans les maladies neurodégénératives

*Ce tableau résume les augmentations (en rouge) et diminutions (en vert) bactériennes intestinales retrouvées chez des patients atteints de troubles neurodégénératifs en comparaison à des sujets contrôles. Pour une même pathologie, certaines études décrivent des modulations bactériennes contradictoires (soulignées) ou similaires (gras). * bactérie modulée dans différents troubles.*

CHAPITRE 3

LE MICROBIOTE INTESTINAL, NOUVELLE PISTE THERAPEUTIQUE POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER

III – Le microbiote intestinal, nouvelle piste thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer

1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA), décrite pour la première fois en 1906 par le psychiatre et neuropathologiste allemand Alois Alzheimer est la principale forme de démence mondiale. C'est une maladie neurodégénérative caractérisée par une mort neuronale démarrant dans les régions temporales et s'étendant progressivement à l'ensemble du cerveau, menant au développement d'altérations cognitives et à une démence entraînant une perte d'autonomie. L'analyse de cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la MA a mis en évidence deux lésions histopathologiques : des plaques amyloïdes extracellulaires constituées de peptides amyloïdes agrégés, et des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires constitués de protéines Tau anormalement phosphorylées.

a. Etiologie et facteurs de risque

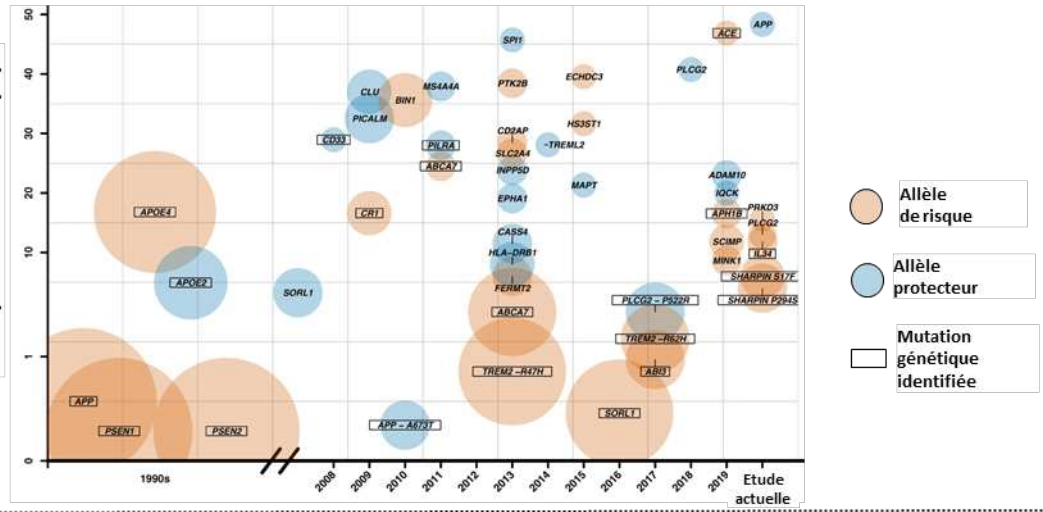
La maladie d'Alzheimer est classiquement identifiée sous deux formes : une forme familiale à début précoce, représentant 2 à 5% des cas, et une forme sporadique d'apparition tardive et d'étiologie complexe, correspondant à la majorité des cas.

Les formes familiales de la MA sont des formes sévères généralement diagnostiquées aux alentours de la cinquantaine. Diverses mutations dominantes hautement pénétrantes ont été identifiés comme causales dans le développement de la pathologie. Elles sont réparties sur trois gènes [Figure 30] : le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde, ou APP (*amyloid precusor protein*), le gène de la préséniline 1, ou PSEN1 (*presenilin 1*), et le gène de la PSEN2 (Barber, 2012). Ces formes précoces de la MA sont également appelées autosomiques dominantes car il suffit d'une seule copie du gène muté pour développer la maladie.

Les formes sporadiques se déclarent plus tardivement et leur origine est inconnue bien qu'un ensemble de facteurs génétiques (Barber, 2012) et environnementaux ont été décrits. Le gène APOE, *via* la présence de son allèle E4, est le principal facteur de susceptibilité génétique de la MA (Safieh et al., 2019). Les consortiums de recherche IGAP (*International Genomics of Alzheimer's Project*) et ADGC (*Alzheimer's Disease Genetics Consortium*) (Lambert et al., 2013; Naj et al., 2011) ont pour objectif de recenser et identifier de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la MA. Ces facteurs génétiques, présentés en [Figure 30], ont pu être identifiés

en premier lieu par l'analyse du génome de familles atteintes de la MA, puis par l'étude de gènes candidats et enfin par l'étude d'associations pangénomiques, ou GWAS (*genome-wide association study*). A cela s'ajoute de nombreux facteurs environnementaux : l'âge, le sexe, l'activité intellectuelle, l'activité physique, la sociabilité, l'alimentation et l'exposition à la pollution, aux pesticides et métaux lourds (De la Rosa et al., 2020; Gu & Scarmeas, 2011; Manivannan et al., 2015; Mielke, 2018; Ruthirakuhan et al., 2012).

A



B

	Nom du gène	Localisation chromosomique	Fonction de la protéine codée (d'après UniProt)
Facteurs génétiques des formes familiales	APP	21	Récepteur membranaire et rôle dans la synaptogenèse, plasticité synaptique, et dans l'homéostasie du fer
	PSEN1	14	Sous-unité catalytique du complexe γ-sécrétase responsable du clivage de l'APP et du récepteur Notch
	PSEN2	1	
Facteurs génétiques des formes sporadiques dont des mutations ont été identifiées	ABCA7	19	Transport de phospholipides
	ABI3	6	Inhibe métastase tumoral et la migration cellulaire
	ACE	17	Enzyme convertissant l'angiotensine I en II
	APH1B	15	Sous-unité du complexe γ-sécrétase
	APOE	19	Transport de lipoprotéines
	CD33	19	Récepteur immunomodulateur
	CR1	1	Récepteur du complément
	IL34	16	Cytokine pro-inflammatoire
	PILRA	7	Récepteur impliqué dans la modulation des réponses immunitaires
	PLCG2	16	Enzyme de la famille des phospholipase C impliquée dans la signalisation transmembranaire
	SHARPIN	8	Protéine post-synaptique. Régule la voie NF-κB
	SORL1	11	Régule le trafic intracellulaire d'APP
	TREM2	6	Récepteur microgliale liant les peptides amyloïdes

Figure 30 – Les gènes impliqués dans les formes familiales et sporadiques de la maladie d'Alzheimer
Représentation non-exhaustive d'après Rojas et al. 2021 des gènes liés à la maladie d'Alzheimer découverts au cours des 30 dernières années, où la taille des cercles présentant les allèles est proportionnelle au risque de développer la pathologie (A) et tableau listant les différents gènes dont une mutation a été identifiée (B).
APP : Amyloid precusor protein. ABCA7 : ATP binding cassette transporter 7. ABI3 : ABI gene family member 3. ACE : Angiotensin-converting enzyme. APH1B : Gamma-secretase subunit APH-1B. APOE : Apolipoprotein E. CD33 : Cluster of differenciation 33. CR1 : Complement-receptor 1. IL34 : Interleukine 34. PILRA : Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha. PLCG2 : 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2. PSEN : Presenilin. SHARPIN : SHANK-associated RH interacting protein. SORL1 : Sortilin-related receptor 1. . TREM2 : Triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

b. Symptomatologie clinique

La MA se caractérise par un déclin progressif au niveau des fonctions cognitives, comportementales et somatiques :

- Les troubles cognitifs, également référencés sous le terme des 4 « A » : amnésie (perte de la mémoire), aphasie (trouble du langage), apraxie (trouble moteur) et agnosie (non reconnaissance d'objets et personnes familières).
- Les troubles psycho-comportementaux : dépression, agitation, agression, difficultés à exprimer ses émotions et psychose avec des idées délirantes et troubles perceptifs (Cerejeira et al., 2012; X.-L. Li et al., 2014) .
- Les troubles somatiques : perturbations du rythme circadien, troubles alimentaires et incontinences urinaires et gastriques (Homolak et al., 2018; Ikeda et al., 2002; Lee et al., 2017).

c. Évolution de la maladie et diagnostic

La maladie d'Alzheimer, diagnostiquée *via* la combinaison d'évaluations neuropsychologiques, d'imagerie cérébrale et du dosage de biomarqueurs, évolue lentement vers une démence irréversible et se divise en différents stades cliniques (A. Kumar et al., 2020) et anatomiques [Figure 31].

i. Stades cliniques

Au stade préclinique, le patient est asymptomatique mais peut présenter une positivité des biomarqueurs de la MA suite à l'analyse du LCS. S'en suit le stade prodromal, également référé sous le nom de déficit cognitif léger ou MCI (*mild cognitive impairment*), où le patient développe des symptômes, essentiellement des troubles de la mémoire, mais est toujours autonome. La recherche de biomarqueurs et des tests génétiques pour identifier la présence potentielle de facteurs de risques génétiques permettent de poser le diagnostic de la MA. Enfin, le stade de démence est atteint lorsque les symptômes du patient impactent sa vie quotidienne et ne lui permettent plus d'être autonome. Ce stade peut être subdivisé en stade de démence modéré, avancé et sévère selon l'importance des troubles cognitifs et l'incapacité à exécuter des tâches quotidiennes.

ii. Stades anatomiques

Hypothèse de Braak

L'anatomiste Heiko Braak a observé sur de nombreux cerveaux *post-mortem* de patients la progression spatio-temporelle de la pathologie Tau (*tubulin-associated unit*) via des immunomarquages dirigés contre la forme phosphorylée de la protéine Tau au niveau du résidu Sérine 202 (Braak & Braak, 1996). Ses observations lui permettent de diviser l'évolution de la pathologie en six stades pouvant être regroupés en trois unités plus générales. Brièvement, la maladie s'initie dans les régions entorhinales et transentorhinales (stade I-II), s'étend dans le cortex limbique notamment dans l'aire hippocampique (stade III-IV) puis dans la région néocorticale (stade V-VI). L'évolution de cette pathologie Tau semble être corrélée avec les symptômes cliniques de la maladie.

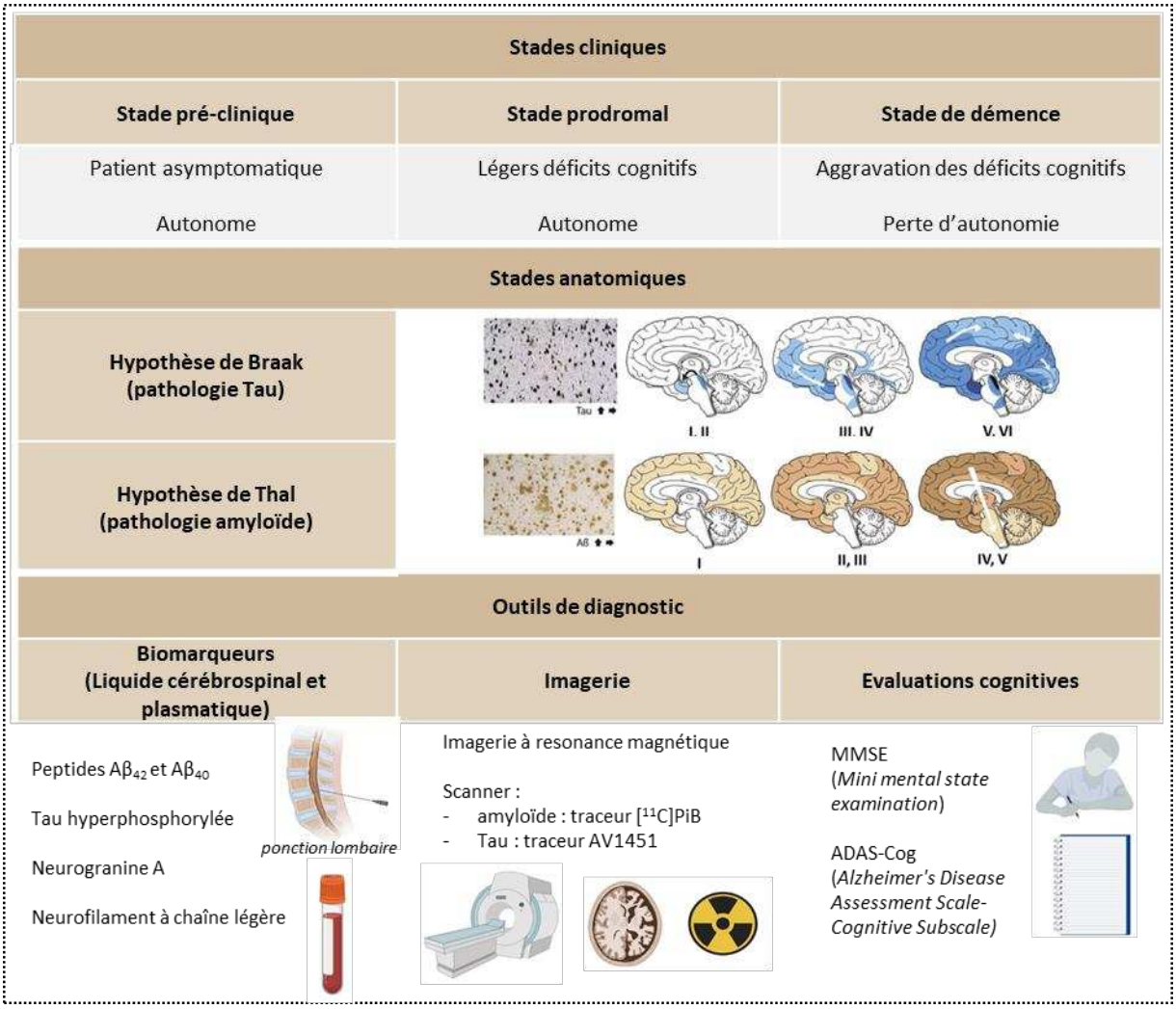


Figure 31 – Les stades cliniques et anatomiques de la maladie d'Alzheimer et les outils de diagnostic
Représentation schématique des trois stades cliniques, des stades anatomiques d'après les hypothèses de Braak et Thal (adapté de Jouanne, Rault, and Voisin-Chiret 2017) et des différents outils de diagnostic.

Hypothèse de Thal

L'anatomiste Dietmar Thal a quant à lui divisé la pathologie en cinq stades basés sur la progression de la pathologie amyloïde via la coloration Campbell-Switzer (Thal et al., 2002). D'après ses observations, la pathologie amyloïde s'initie dans le néocortex (stade 1), puis dans l'allocortex (stade 2), le diencéphale et les ganglions de la base (stade 3), dans le tronc cérébral et le mésencéphale (stade 4) et enfin dans le cervelet (stade 5).

iii. Diagnostic

Le système de classification ATN aide au diagnostic de la MA et est basé sur une combinaison de biomarqueurs : la présence de peptides amyloïdes (A), la présence de Tau hyperphosphorylée (T) et la présence d'une neurodégénérescence cérébrale (N) (Jack et al., 2016). Pour ce faire, le dosage de biomarqueurs dans le LCS et dans le sang ainsi que de l'imagerie cérébrale sont effectués aux patients. A cette classification s'ajoute également l'évaluation des performances cognitives [Figure 31].

Biomarqueurs dans le LCS et dans le sang

Suite à une ponction lombaire, le dosage de biomarqueurs dans le LCS de patients atteints de la MA présente les caractéristiques suivantes : une diminution du taux du peptide amyloïde-β_{42} ou $A\beta_{42}$ (*amyloid*-β *42* ; principal constituant des dépôts amyloïdes cérébraux), une diminution du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, une augmentation du taux de la protéine Tau totale et de ses formes phosphorylées notamment au niveau des résidus 181, 199 et 231, et une augmentation de la Neurogranine, une protéine de liaison à la calmoduline fortement exprimée dans les épines dendritiques neuronales (Blennow & Zetterberg, 2018). Ces biomarqueurs sont également retrouvés dans le sang. Des progrès technologiques améliorant la sensibilité de leur détection plasmatique permettent d'envisager un dosage systématique et moins invasif en cas de plainte cognitive (Cullen et al., 2021; Liu et al., 2020). Le neurofilament à chaîne légère (NFL), est également un biomarqueur prometteur, qui augmente dans le LCS et dans le sang, et qui permet de monitorer la dégénérescence neuronale (Xiong et al., 2021).

Imagerie cérébrale

En accord avec le dosage du peptide $A\beta_{42}$, le PET scan (*positron emission tomography*) utilisant le traceur Pittsburgh B, [^{11}C]PiB, permet d'identifier de manière spécifique et région-dépendante la présence du peptide $A\beta_{42}$ au niveau cérébral. Un traceur de la protéine Tau,

8F-flortaucipir, ou AV1451, vient d'être approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) (Barthel, 2020) et d'autres traceurs permettant l'imagerie de Tau sont en cours de développement (Joie et al., 2020). L'observation d'une atrophie cérébrale par IRM (Imagerie à résonance magnétique) au niveau du lobe temporal médian ainsi qu'un élargissement des ventricules est également un critère de diagnostic et de sévérité pour la MA (Frisoni et al., 2010) [Figure 32].

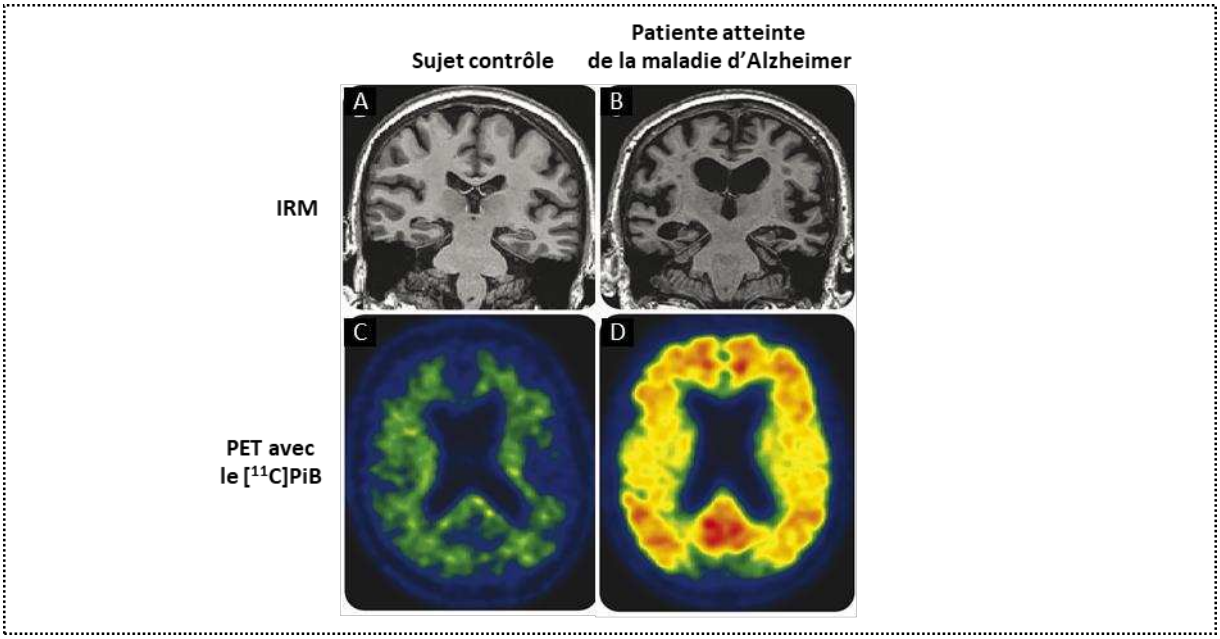


Figure 32 – Imagerie cérébrale d'un sujet contrôle et d'une personne atteinte de la maladie d'Alzheimer
Imagerie cérébrale par IRM d'un sujet contrôle (A) et d'une patiente atteinte de la maladie d'Alzheimer (B) montrant une neurodégénérescence temporale et un élargissement des ventricules. PET scan amyloïde des mêmes sujets avec le traceur [11C]PiB (C-D). D'après Jack et al. 2016. IRM : imagerie à résonance magnétique. PET : positron emission tomography.

Évaluation cognitive

Le diagnostic des patients se base également sur des évaluations cognitives mesurant les capacités de mémoire, langage, résonnement et perception. Le test le plus couramment utilisé est le MMSE (*Mini mental state examination*) noté sur un total de 30. Cependant, certains chercheurs suggèrent qu'il ne permet pas de différencier une cognition normale d'un léger déficit cognitif, ni le léger déficit cognitif d'une personne saine et celui d'un patient Alzheimer, ou de différencier les stades de démence (Chapman et al., 2016). Une autre évaluation cognitive très utilisée, notamment dans l'évaluation des essais cliniques est l'ADAS-Cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale*). L'ADAS-Cog comprend 10 tâches évaluant les changements d'humeur et de comportement qui peuvent survenir dans la maladie d'Alzheimer et d'autres formes de démence (Cano et al., 2010).

2. Neurophysiopathologie de la maladie d'Alzheimer

a. Marqueurs histopathologiques

La MA est caractérisée par deux principales lésions cérébrales : une accumulation extracellulaire de peptides amyloïdes sous forme de plaques amyloïdes (ou plaques séniles) et une accumulation intracellulaire de formes hyperphosphorylées de la protéine Tau appelée enchevêtrements neurofibrillaires (Maurer et al., 1997).

Ces marqueurs peuvent également être observés dans d'autres pathologies cérébrales. En effet, les patients atteints de certaines formes de démences fronto-temporales ou de paralysie supra nucléaire progressive présentent des enchevêtrements neurofibrillaires (Bodea et al., 2016; Martínez-Maldonado et al., 2021), et les personnes atteintes du syndrome de Down (ou trisomie 21) des plaques amyloïdes (Zammit et al., 2020). Ces lésions cérébrales peuvent également être retrouvés au cours du vieillissement et chez des personnes ne présentant aucune atteinte cognitive (Delacourte et al., 2002; Kamer et al., 2015).

i. Plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont constituées d'agrégats de peptides amyloïdes, principalement $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$, issus du clivage d'une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire : la protéine APP (Thinakaran & Koo, 2008). Cette dernière possède trois isoformes principales : APP695, APP751 et APP770 toutes exprimées au niveau cérébral chez l'homme (Rockenstein et al., 1995). Au niveau subcellulaire, l'APP est principalement exprimée au niveau des terminaisons axonales (Kins et al., 2006).

Métabolisme de l'APP

Le métabolisme de l'APP s'effectue selon deux voies principales : une voie dite amyloïdogène menant à la production des peptides Aβ, et une voie dite non-amyloïdogène [Figure 33A]. Les principales enzymes protéolytiques responsables du clivage de l'APP, appelées sécrétases, sont au nombre de trois : l'α-sécrétase, la β-sécrétase et la γ-sécrétase.

Voie amyloïdogène

La première étape du clivage amyloïdogène de l'APP est effectuée par une β-sécrétase, la principale étant la protéine transmembranaire BACE1 (Vassar et al., 1999). BACE1 clive l'ectodomaine de l'APP menant à la libération extracellulaire d'un fragment soluble sAPPβ et

à la formation du fragment C99, ou CTFβ (*carboxy-terminal fragment* β) ancré à la membrane. S'en suit le clivage de C99 par la γ-sécrétase dans l'environnement hydrophobe de la membrane plasmique qui conduit à la production extracellulaire du peptide Aβ, et au niveau intracellulaire du fragment AICD (*APP intracellular domain*) (Haass, 2004). L'activité γ-sécrétase est exercée par un complexe composé au minimum de quatre sous-unités : les présénilines 1 ou 2, la nicastrine, l'APH1 (*anterior pharynx defective 1*) et la PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) (X. Zhang et al., 2014).

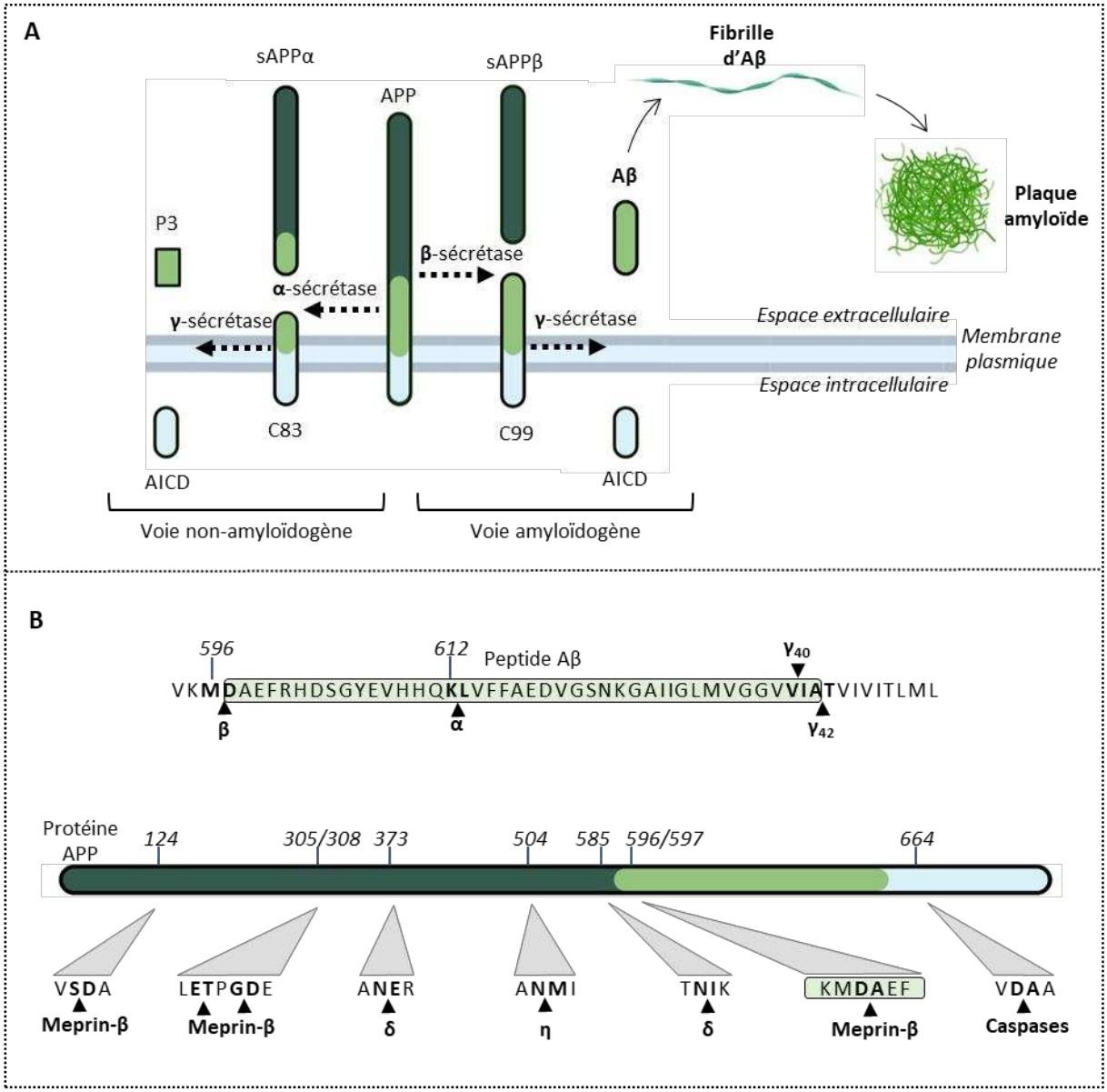


Figure 33 – Métabolisme de l'APP

Représentation schématique du métabolisme de l'APP selon les voies canoniques (A) comprenant la voie non-amyloïdogène et la voie amyloïdogène conduisant à la formation de fibrilles et de plaques amyloïdes, et les sites de clivage des voies non-canoniques (B) adapté de Müller, Deller, and Korte 2017.

Voie non-amyloïdogène

La première étape du clivage non-amyloïdogène de l'APP est effectuée par une α-sécrétase telle que la protéine transmembranaire ADAM10 (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) qui est l'α-sécrétase majeure au niveau cérébral (Allinson et al., 2003). L'ADAM10 clive l'APP au sein de la séquence du peptide Aβ, prévenant sa production et menant à la libération extracellulaire d'un fragment soluble sAPPα et à la formation du fragment C83, ou CTFα (Esch et al., 1990), ancré à la membrane. S'en suit le clivage du C83 fragment par la γ-sécrétase, toujours dans l'environnement hydrophobe de la membrane plasmique, menant à la production extracellulaire du peptide P3, et au niveau intracellulaire à celle du fragment AICD (Haass et al., 1993).

Clivages non-canoniques

D'autres voies de clivage de l'APP ont récemment été découvertes [Figure 33B]. L'η-sécrétase (Willem et al., 2015) et l'δ-sécrétase (Zhang et al., 2015) clivent l'ectodomaine de l'APP qui est concomitamment clivable par l'α- ou β-sécrétase, et par la β- et γ-sécrétase. Un autre site de clivage, appelé epsilon (ε), et situé à proximité du site de clivage de la γ-sécrétase a été rapporté (Weidemann et al., 2002). Un clivage combiné par la métalloprotéase Meprin-β (Becker-Pauly & Pietrzik, 2016) et la γ-sécrétase a également été décrit. Un des sites de clivage de la Meprin-β étant à proximité du site de clivage de la β-sécrétase, il en résulte une production de peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ tronqués d'un seul résidu qui sont en capacité de s'agréger. Enfin, l'APP peut également être clivé par des caspases (Milligan, 2000).

Clivages subcellulaires

L'APP est retrouvé dans plusieurs compartiments cellulaires : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes et les membranes mitochondriales. Seule une faible proportion de l'APP produit atteint la membrane plasmique (environ 10%), la majorité restant dans l'appareil de Golgi. L'APP membranaire non-clivé est rapidement internalisé dans les endosomes, pour être recyclé et reconduit à la membrane, ou alors être dégradé dans les lysosomes. Durant ce trafic intracellulaire, il a été montré que l'APP peut être clivé par les α-, β- et γ-sécrétase (Haass et al., 2012).

Fonction de l'APP et de ses produits de clivage

De nombreuses fonctions physiologiques ont été décrites pour l'APP et ses produits de clivage, brièvement résumées dans le tableau 6 (Brothers et al., 2018; Chasseigneaux & Allinquant, 2012;

Duce et al., 2010; Lauritzen et al., 2016; Müller & Zheng, 2012; Nhan et al., 2015; Pardossi-Piquard & Checler, 2012; Shankar et al., 2008; Wei et al., 2002).

Protéine/Fragment	Fonctions physiologiques
APP	Plasticité synaptique, adhésion et migration cellulaire, homéostasie métallique
sAPPα	Plasticité synaptique, neuritogenèse, prolifération cellulaire, homéostasie du cuivre et du zinc, neuroprotection (excitotoxicité glutamatergique, toxicité amyloïde)
sAPPβ	Neuroprotection (plus faible que sAPPα)
C83 (αCTF) ou C99 (βCTF)	Fonction C83 mal connue. C99 : neurotoxique, dysfonctionnement lysosomal
AICD	Régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et la clairance des peptides Aβ
P3	Mort neuronale et réponse inflammatoire
Aβ	Activité antimicrobienne, suppresseur tumoral, régulation activité synaptique, pro-oxydant, dysfonctionnement plasticité synaptique

Tableau 6 – Fonctions physiologiques de la protéine APP et de ses produits de clivage

Peptides amyloïdes et agrégation

Les peptides Aβ produits lors du clivage amyloïdogène de l'APP sont de longueur variable en fonction du site de clivage par la γ-sécrétase. Les deux formes principalement produites sont l'$A\beta_{40}$ et l'$A\beta_{42}$. Dans la MA, il a été rapporté une perturbation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ dans le LCS avec une augmentation du taux d'$A\beta_{42}$. Proportionnellement, le peptide $A\beta_{40}$ est plus abondant, représentant à lui seul 95% des peptides Aβ produits, mais il est moins toxique que le peptide $A\beta_{42}$. En effet, ce dernier a une plus forte capacité à s'agréger en feuillets-β favorisant la formation d'oligomères, de fibrilles et enfin de plaques amyloïdes (Gu & Z, 2013). La formation de ces plaques amyloïdes se produit en effet suite à un processus de polymérisation des monomères d'Aβ qui peut être divisé en une phase de nucléation et une phase d'élongation [Figure 34]. Dans la phase de nucléation, les monomères d'Aβ, qui ont une formation α-héliocoïdale, vont adopter une conformation en feuillet-β et former des oligomères (principalement dimères et trimères). S'en suit la phase d'élongation, plus rapide,

où les oligomères s'agrègent formant ainsi des protofibrilles qui vont maturer en fibrilles pour enfin conduire à la formation de plaques amyloïdes (S. Kumar & Walter, 2011).

Bien que les oligomères soient solubles et puissent être dégradés, de nombreuses études suggèrent qu'ils soient plus neurotoxiques que les plaques. En effet, il existe une corrélation entre le taux d'oligomères, notamment de petites tailles, et le déclin cognitif, suggérant un effet protecteur de l'agrégation en plaques afin de réduire la quantité d'oligomères solubles dans l'espace extracellulaire.

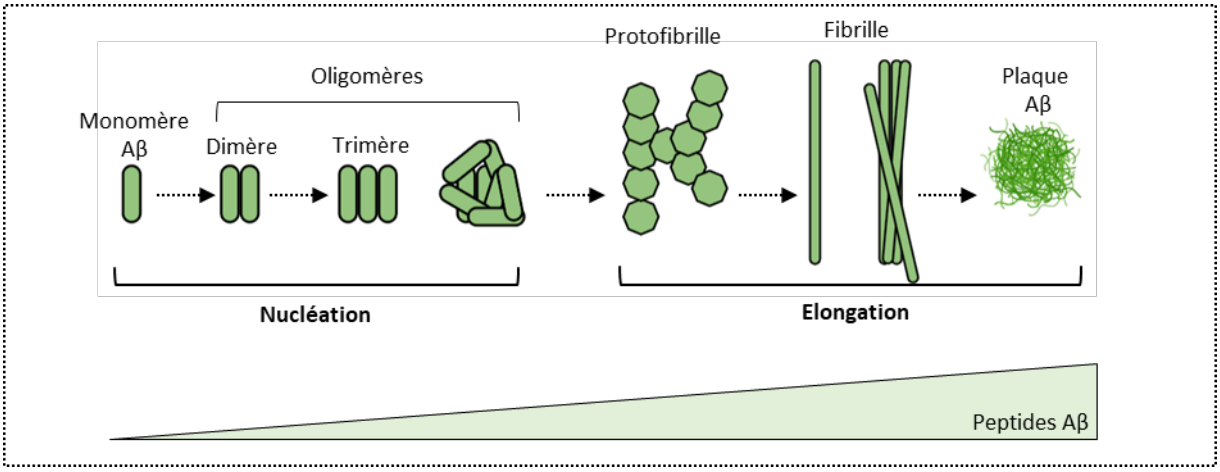


Figure 34 – Formation des plaques amyloïdes

Représentation schématique des étapes de nucléation et d'élongation des monomères d'Aβ en plaques amyloïdes.

Propagation de la pathologie amyloïde

La propagation dans les différentes régions corticales est un mécanisme appelé le « *seeding* » qui est similaire aux mécanismes observés dans les maladies à prions. Brièvement, les peptides Aβ nouvellement produits vont adopter une conformation en feuillets-β en présence d'autres peptides Aβ en feuillets-β et ainsi être en capacité de s'agréger (Walker & M, 2015). Ce mécanisme dit « *prion-like* » est supporté par des études démontrant qu'une injection cérébrale unilatérale d'un homogénat de cerveau provenant de souris âgées APP23 C57BL/6, un modèle transgénique de la MA, et donc comprenant des agrégats Aβ, est en capacité d'accélérer le développement d'une amyloïdose chez ce même modèle de souris à un âge plus jeune et ce également au niveau controlatéral du site d'injection (Stöhr et al., 2012). De même, les injections d'homogénats de cerveaux de patients qui étaient atteints de la MA chez le modèle de souris huAPPwt qui ne développe pas de plaques amyloïdes spontanément, et chez le microcèbe, un primate non-humain, induisent le développement de plaques amyloïdes aux alentours du site d'injection (Gary et al., 2019; Hérard et al., 2020).

Pathologie amyloïde vasculaire

Des études ont montré la présence d'une pathologie amyloïde au niveau des vaisseaux corticaux, appelée angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), qui est fortement associée à la MA. De tels dépôts au niveau vasculaire sont également retrouvés dans le modèle de souris 5XFAD C57BL/6SJL (Giannoni et al., 2016). Les péricytes, qui font partie de l'unité neurovasculaire de la barrière hémato-encéphalique, participent à la clairance des peptides amyloïdes en les internalisant, et voient leur fonction altérée dans le cadre d'une AAC (S. H. Kim et al., 2020; Ma et al., 2018).

ii. Enchevêtrements neurofibrillaires

La protéine Tau

La protéine Tau, exclusivement exprimée au sein du SNC, aussi bien dans les cellules neuronales et non-neuronales, est une protéine associée aux microtubules, MAP (*microtubule-associated protein*) et qui permet leur stabilisation et leur bon fonctionnement. Son gène, situé sur le chromosome 17, peut donner lieu à six isoformes pouvant être regroupées en deux groupes selon le nombre de domaines MBD (*microtubule-binding domain*) permettant la liaison aux microtubules : Tau3R et Tau4R ayant respectivement trois et quatre domaines MBD, ce qui donne une meilleure affinité pour les microtubules aux isoformes Tau4R [Figure 35A].

Cette protéine possède de nombreux sites de phosphorylation dont certains sont situés à proximité des domaines MBD, rendant ainsi son état de phosphorylation décisif pour effectuer sa fonction de MAP (Buée et al., 2000).

Hyperphosphorylation de Tau et agrégation

Chez les patients atteints de la MA, un déséquilibre dans l'activité des kinases et phosphatases conduit à une dérégulation de l'état de phosphorylation de la protéine Tau en faveur d'une hyperphosphorylation induisant une déstabilisation microtubulaire et une mort neuronale [Figure 35B].

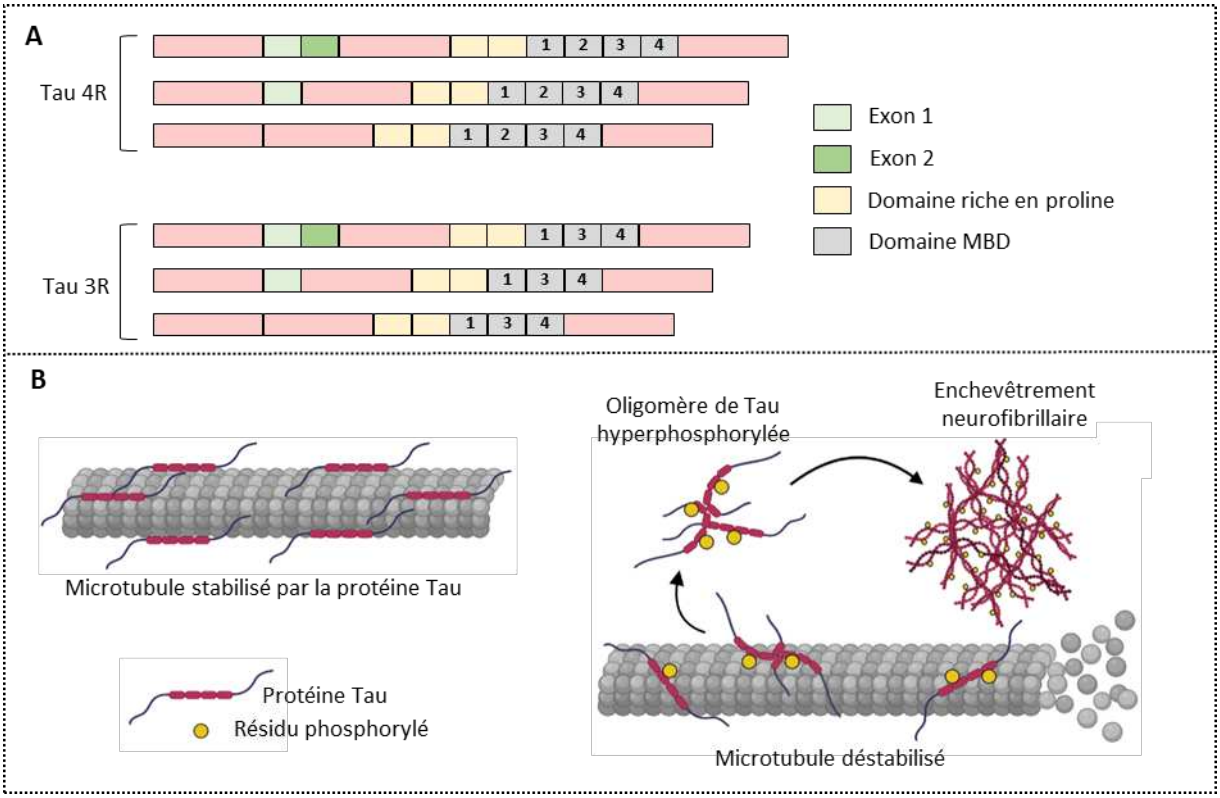


Figure 35 – Isoformes de Tau et déstabilisation microtubulaire par l'hyperphosphorylation de Tau
Représentation schématique des 6 isoformes de la protéine Tau (A) et de son hyperphosphorylation et son agrégation menant à la déstabilisation des microtubules (B). MBD : microtubule-binding domain.

Des études suggèrent une diminution de l'activité de la phosphatase PP2A (*Protein phosphatase-2*) et une augmentation de l'activité des kinases GSK-3β (*Glycogen-synthase kinase-3β)*, Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*), SAPK/JNK (*stress activated kinase/c-Jun N-terminal kinase*), p38 et Fyn (Dolan & Johnson, 2010; Ferrer, Gomez-Isla, et al., 2005). L'état de phosphorylation de Tau est également régulé par la quantité de O-GlcNAc (*O-linked N-acetylglucosamine*) sur les résidus sérine et thréonine, appelée l'O-GlcNAcylation et impliquant deux familles enzymatiques : les O-GlcNAc transférases et les N-acetylglucosaminidases (OGA) catalysant respectivement l'ajout ou le retrait de ces glucosamines (Yang & K, 2017). Il a été démontré que les peptides Aβ ainsi que le dérèglement du métabolisme du glucose au niveau cérébral, qui induit une diminution de O-GlcNAcylation, sont aussi responsables de cette hyperphosphorylation de Tau (Busciglio et al., 1995; Liu et al., 2004).

Similairement aux peptides Aβ, des agrégats insolubles de la protéine Tau vont se former suite à un processus de nucléation et d'élongation. Les protéines Tau hyperphosphorylées vont s'oligomériser pour donner lieu à des filaments appelés PHF (*paired helical filaments*). Ces derniers ne permettent pas une bonne stabilisation des microtubules qui vont alors se

désintégrer et conduire à une mort neuronale. A noter que la déstabilisation des microtubules ne semble pas être exclusivement due à l'agréation de protéines Tau hyperphosphorylées entre elles mais également à l'agrégation de protéines Tau hyperphosphorylées avec des protéines Tau normalement conformées et d'autres MAP telles que MAP1 et 2 (Alonso et al., 1997). Les PHF vont par la suite s'agréger formant ainsi des enchevêtrements neurofibrillaires insolubles, ou NFT (*Neurofibrillary tangles*).

De nombreuses études suggèrent, tout comme les peptides et oligomères Aβ, que les protéines et agrégats solubles de Tau hyperphosphorylés sont plus neurotoxiques que les NFT insolubles (Kopeikina et al., 2012).

Propagation de la pathologie Tau

Similairement à la propagation des agrégats amyloïdes, la propagation de la pathologie Tau dans différentes régions cérébrales semble se produire via un mécanisme « *prion-like* » qui implique le transfert des protéines Tau d'une cellule « donneuse » à une cellule « receveuse » (Mudher et al., 2017). Les mécanismes connus et hypothétiques de ce transfert sont illustrés en [Figure 36] :

- Les protéines Tau peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire via des exosomes ou ectosomes. Le mécanisme par lequel ces protéines vésiculaires atteignent le cytoplasme de la cellule receveuse reste méconnu.
- Les protéines Tau sont majoritairement retrouvées sous forme libre dans le milieu extracellulaire (90%). L'exocytose et/ou la diffusion au travers de la membrane plasmatique pourraient être responsable de cette sécrétion. Pour l'entrée dans la cellule receveuse des formes libres de Tau, il a été démontré qu'il existe une endocytose médiée par l'APP et l'HSPG (*Heparan Sulfate ProteoGlycan*). Cependant, l'existence d'une endocytose non-médiée par des récepteurs ou une entrée par diffusion reste méconnue.
- Enfin, il a été démontré *in vitro* l'existence de la formation de nanotubes entre la cellule « donneuse » et la cellule « receveuse » permettant le passage de protéines Tau, mais ce mécanisme n'a pas encore été confirmé *in vivo*.

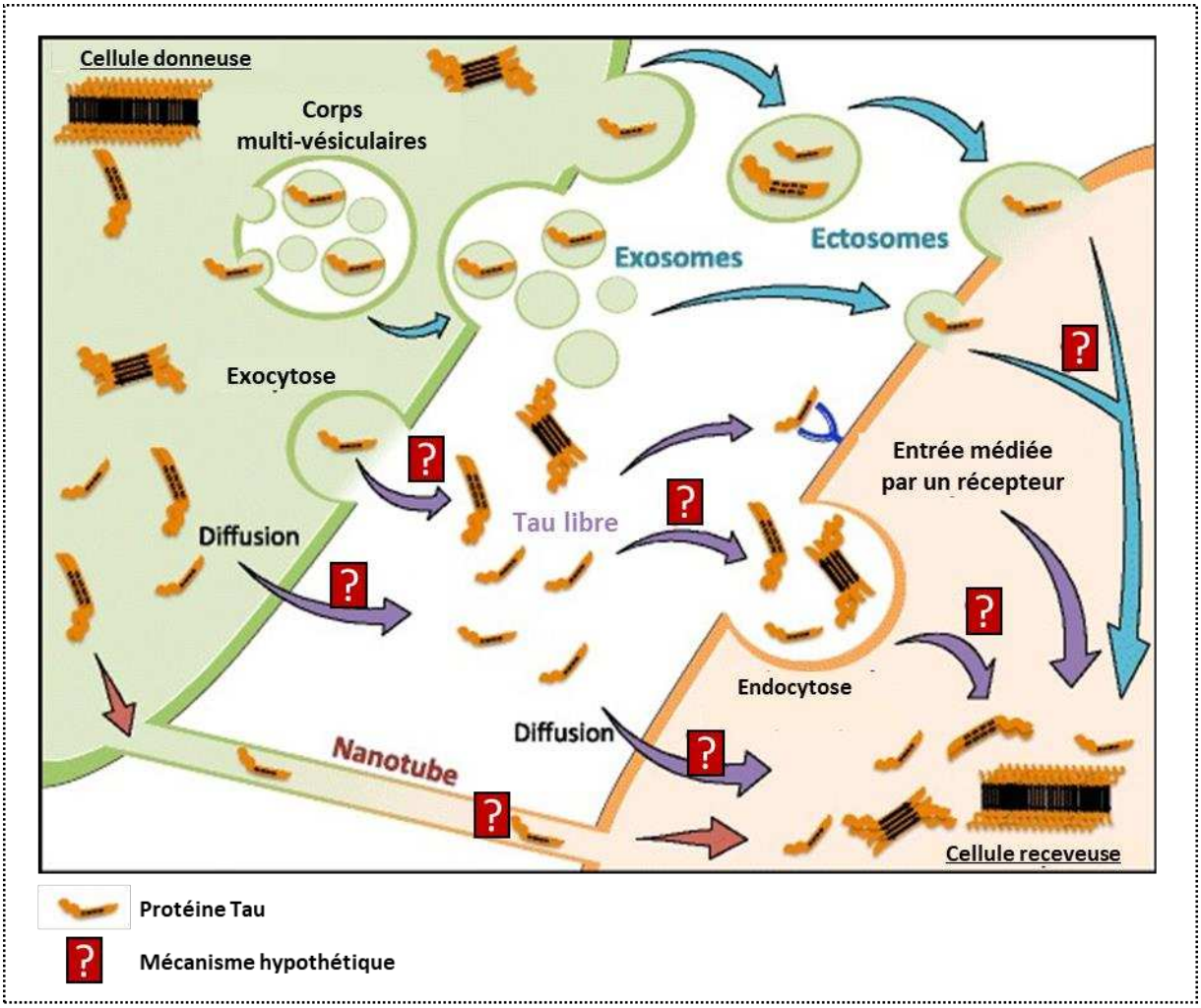


Figure 36 – Transfert transcellulaire de la protéine Tau

Représentation schématique adaptée de Mudher et al. 2017 des mécanismes connus et hypothétique du transfert de Tau d'une cellule à une autre.

Récemment, le Dr. J. Götz et ses collègues ont découvert un nouveau mécanisme de propagation des agrégats de Tau (Polanco et al., 2021). Ils ont démontré que les membranes des exosomes contenant des agrégats de Tau, suite à leur internalisation dans les endolysosomes, peuvent être résistantes en partie à la dégradation par les enzymes lysosomales et ainsi être perméabilisées et permettre aux agrégats Tau de s'échapper dans le cytosol où ils peuvent recruter d'autres protéines Tau solubles. Par ailleurs, il a été démontré qu'il y a un échange bidirectionnel de peptides Tau entre les cellules neuronales et astrocytaires (Gérando et al., 2021).

Fonctions de Tau

La protéine Tau a un rôle primordial dans la stabilisation des microtubules et le transport axonal, notamment des mitochondries (Pérez et al., 2018) mais possède d'autres partenaires et différentes localisations subcellulaires suggérant d'autres fonctions (Sotiropoulos et al., 2017) :

- Au niveau axonal : un gradient de Tau phosphorylé au niveau du site Tau-1 (Thr^{198}-Ser^{205}) est présent entre le compartiment somato-dendritique des neurones et l'axone (taux de phosphorylation de 80% contre 20%), suggérant un rôle dans la formation axonale (Mandell & GA, 1996).
- Au niveau dendritique et synaptique : la protéine Tau module la phosphorylation des récepteurs NMDA et régule l'activité des protéines IRS-1 (*insulin-receptor substrate 1*) et PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), toute deux impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline. L'hyperphosphorylation de Tau et son agrégation engendrerait une altération dans cette voie et serait donc impliquée dans l'insulino-résistance cérébrale observée chez les patients (Marciniak et al., 2017).
- Au niveau nucléaire et des centrosomes : la protéine Tau participe au maintien de l'intégrité de l'ADN et de l'hétérochromatine péri-centrosomique (Mansuroglu et al., 2016).

b. Marqueurs associés

i. Neuroinflammation

Outre les deux lésions cérébrales précédemment décrites, une neuroinflammation persistante est observée chez les patients atteints de la MA. Les acteurs principaux de cet état inflammatoire sont les cellules microgliales et astrocytaires, largement présentes au voisinage des plaques amyloïdes et des enchevêtrement neurofibrillaires.

Aux stades précoces de la pathologie, l'activation de ces cellules présente des effets bénéfiques *via* la clairance des peptides Aβ et Tau. Cependant, à long terme, le maintien de cet état inflammatoire participe à la neurotoxicité et à la progression de la pathologie.

Microglie et astrocytes

Aux stades précoces de la pathologie, les cellules microgliales et astrocytaires vont adopter un profil phagocytaire permettant la clairance des peptides amyloïdes et Tau. Une étude récente démontre que les peptides Aβ induisent une augmentation sur les cellules

microgliales de l'expression du récepteur de l'IL-3, une cytokine constitutivement sécrétée par les astrocytes. S'en suit une activation de la microglie par l'IL-3 augmentant ainsi la capacité microgliale à éliminer les agrégats amyloïdes et Tau (McAlpine et al., 2021). La sécrétion de métalloendopeptidases telles que l'ECE1, ECE2 (*endothelin-converting enzyme*) et la néprilysine (NEP), et la sécrétion des métalloprotéinases matricielles MMP2 et 9 (*matrix metalloproteinase*) par ces cellules immunitaires va également permettre la dégradation des dépôts amyloïdes (Miners et al., 2011; Ries & Sastre, 2016).

Cependant, la présence continue de ces dépôts Aβ entraîne une activation chronique des cellules microgliales et astrocytaires qui est responsable du développement d'un environnement inflammatoire, présentant notamment une surexpression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1β et le TNF-α, et d'une diminution de la clairance des peptides amyloïdes et de l'élimination de la protéine Tau hyper- ou anormalement phosphorylée. Une diminution de la fonction de recapture du glutamate par les astrocytes est également observée favorisant l'excitotoxicité et une augmentation des pertes synaptiques (Kaur et al., 2019). Enfin, des études ont démontré qu'un environnement pro-inflammatoire soutenu augmente l'expression de l'APP et l'activité des sécrétases β et γ (Alasmari et al. 2018) et accentue l'activité des kinases responsables de l'hyperphosphorylation de Tau (Bernhardi, Tichauer, and Eugenín 2010).

Inflammasome et récepteurs microgliaux/astrocytaires

L'inflammasome NLRP3, se trouve augmenté dans le cerveau de patients atteints de la MA et joue un rôle essentiel dans la progression de la pathologie amyloïde. Il a été montré que son activation dans le modèle murin APP/PS1 de la MA induit une augmentation de la sécrétion de l'IL-1β, des dépôts amyloïdes et des pertes synaptiques, tandis que sa délétion favorise la clairance des peptides amyloïdes (Zhang et al., 2020). De même, NLRP3 régule l'activité des phosphatases/kinases de Tau, sa perte de fonction réduisant l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau dans le modèle murin Thy-Tau22 C57BL/6N (Ising et al., 2019).

Le récepteur TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cell 2*), pouvant lier les peptides amyloïdes et dont des mutations ont été identifiées comme facteurs de risque génétiques des formes sporadiques de la MA, a particulièrement été étudié. Sa délétion *in vitro* et *in vivo* entraîne une diminution de l'activité phagocytaire microgliale (Wang et al., 2015; Xiang et al., 2016). Par ailleurs, la réponse inflammatoire microgliale entraîne une augmentation de

l'hyperphosphorylation de Tau au niveau neuronal qui peut être régulée négativement par TREM2. La surexpression *in vitro* de TREM2 diminue le taux de Tau hyperphosphorylée, et à l'inverse, sa délétion *in vivo* entraîne une augmentation de la pathologie Tau dans le modèle murin Thy-Tau22 C57BL/6J (Jiang et al., 2018; Vautheny et al., 2021).

Enfin, les récepteurs purinergiques modulent l'activité inflammatoire microgliale (Pietrowski et al., 2021), notamment *via* les récepteurs $P2X_4$, $P2X_7$, A_1 et A_{2A} qui se trouvent augmentés chez les patients atteints de la MA (Angulo et al., 2003; Francistiová et al., 2020). Les récepteurs $P2Y_2$ et $P2Y_6$ contrôlent également l'activité phagocytaire (Ajit et al., 2014; Neher et al., 2014). De même, le récepteur $P2Y_1$ module les propriétés des cellules astrocytaires et semblerait être responsable de leur hyperactivation observée dans la MA (Reichenbach et al., 2018).

ii. Stress oxydant

Le stress oxydant est un processus qui augmente au niveau cérébral au cours du vieillissement et qui est dû à un déséquilibre redox se caractérisant par un excès du taux d'espèces réactives de l'oxygène, ou ROS (*reactive oxygen species*). Ces dernières correspondent en majorité à l'anion superoxyde O_2^- et au peroxyde d'hydrogène H_2O_2. De par leur instabilité, elles peuvent réagir et oxyder les composants cellulaires (lipides, protéines, acides nucléiques), perturbant ainsi leurs propriétés, et induire une mort cellulaire (Juan et al., 2021).

Chez les patients atteints de la MA, un stress oxydant important est observé qui est provoqué par un ensemble de dérégulations résumées ci-dessous.

Mitochondrie

La chaîne respiratoire mitochondriale va produire, *via* la consommation d'oxygène et les chaînes de transport d'électrons, une grande quantité d'énergie sous forme d'ATP, et une infime quantité de ROS. Les personnes atteintes de la MA présentent de nombreux dysfonctionnements au niveau mitochondrial qui peuvent expliquer l'augmentation de la production de ROS : morphologie, quantité, oxydation et mutation de l'ADN, biogénèse mitochondriale, transport axonal et activité des enzymes mitochondriales sont ainsi altérés (Cenini & Voos, 2019). Il a été démontré que les peptides amyloïdes et les protéines Tau hyperphosphorylées participent à ces dysfonctionnements (Cheng & Bai, 2018; Pagani & Eckert, 2011).

Homéostasie calcique

Par ailleurs, une dérégulation de l'homéostasie du calcium est présente dans la MA, provoquant une augmentation de la production de ROS (Görlach et al., 2015; Y. Wang et al., 2017). Des études ont montré que les oligomères d'Aβ et les protéines Tau mal-repliées peuvent participer à cette dérégulation, respectivement, en augmentant l'influx calcique depuis l'espace extracellulaire et en diminuant l'efflux calcique mitochondrial (Britti et al., 2020; Drews et al., 2016). De même, l'excitotoxicité glutamatergique observée dans la MA participe à cette augmentation calcique cytosolique (Dong et al., 2009).

Métaux

Enfin, l'homéostasie des métaux est perturbée dans la MA avec une augmentation extracellulaire des taux de cuivre et de zinc et une augmentation intracellulaire du fer qui peuvent contribuer à la production de ROS (Valko et al., 2005). L'interaction des protéines APP et Tau avec ces métaux explique la dérégulation de l'homéostasie métallique dans la MA :

- La protéine Tau a un rôle dans l'export de fer *via* son implication dans l'adressage de l'APP à la membrane plasmique (Lei et al., 2012; S. S. Rao & Adlard, 2018). En effet, l'APP interagit et stabilise la ferroportine, une protéine membranaire impliquée dans l'export de fer (B. X. Wong et al., 2014).
- L'APP possède deux sites de liaison pour le cuivre et le zinc : au niveau N-terminal et au niveau du peptide Aβ (Maynard et al., 2002). L'augmentation de la production des peptides amyloïdes et leur agrégation dans l'espace extracellulaire dans la MA pourrait ainsi expliquer l'augmentation des taux de ces deux métaux retrouvés chez les patients.

iii. Plasticité synaptique et neurotransmission

Perte synaptique

L'analyse de cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la MA a permis de mettre en évidence une perte synaptique, attestée par une diminution du nombre de synapses et des protéines synaptiques, qui semblerait être fortement corrélée avec les déficits cognitifs. Des études en modèles précliniques murins ont également permis de montrer que les peptides Aβ et la protéine Tau ont un rôle causal dans ces pertes synaptiques qui sont associées à une altération de la plasticité synaptique comprenant une dérégulation de la potentialisation à

long terme, ou LTP (*long-term potentiation*), et de la dépression à long terme, ou LTD (*long-term depression*) (Colom-Cadena et al., 2020; Coomans et al., 2021; Mucke & Selkoe, 2012).

Une quantité modérée d'Aβ induit en premier lieu une facilitation de la sécrétion glutamatergique au niveau présynaptique en se liant aux récepteurs α_7-ACh. Par la suite, l'augmentation de cette libération présynaptique, provoquée par l'accumulation d'Aβ, induit l'endocytose des récepteurs glutamatergiques au niveau postsynaptique qui est responsable d'une LTD (Mucke & Selkoe, 2012).

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau entraîne une altération du fonctionnement synaptique *via* différents mécanismes : perturbation du transport axonal mitochondrial, modulation de la signalisation des récepteurs muscariniques mAChR et modulation de la présence des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques (Forner et al., 2017).

Neurotransmission

Les systèmes altérés

L'ensemble des systèmes de neurotransmission (principalement cholinergique, glutamatergique et sérotoninergique) sont altérés dans la MA.

Le système cholinergique est le principal impliqué (Ferreira-Vieira et al., 2016) car il interagit avec les différents systèmes de neurotransmission en raison de l'expression de récepteurs nicotiniques au niveau présynaptique. Chez les patients atteints de la MA, une perte des neurones cholinergiques associée à une diminution du taux d'ACh, est observée. Les récepteurs de l'ACh sont de deux types : les récepteurs nicotiniques (nAChR) qui sont perméables aux ions calciques et dont le plus abondant dans le CNS est l'α_7-AChR, et les récepteurs muscariniques (mAChR ou M1-5) qui sont des RCPG (récepteurs couplés aux protéines G).

Le système glutamatergique (Butterfield & Pocernich, 2003) comprend les récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, Kaïnate) (AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) et métabotropiques (mGluR). Une augmentation du taux de glutamate dans la fente synaptique est observée dans la MA, induisant une hyperactivation des récepteurs NMDA et une mort neuronale, également appelé excitotoxicité. Cette dernière peut provenir d'une diminution de la recapture du glutamate par les astrocytes dûe à une altération de la fonction du transporteur astrocytaire EAAT1 (e*xcitatory amino acid transporter-1*) et à une augmentation de la sécrétion de glutamate induite par la production d'Aβ. Par ailleurs, une

diminution de l'expression des récepteurs AMPA induite par l'accumulation d'Aβ est observée (Zhang et al., 2018).

En ce qui concerne le système sérotoninergique, une diminution du taux de 5-HT dans le cortex temporal, frontal et pariétal ainsi que dans l'amygdale, le noyau caudé, le putamen, le noyau du raphé et l'hippocampe est observée chez les patients atteints de la MA(Rodríguez et al., 2012). Une diminution de l'expression de plusieurs récepteurs de la 5-HT (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_4 et 5-HT_6) est également observée dans les régions frontales et temporales.

Les récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG sont une superfamille de récepteurs transmembranaires pouvant être subdivisée en 5 sous-familles basées sur la similarité de leur séquence et structure : les récepteurs de la rhodopsine (famille A), les récepteurs de la sécrétine (famille B), les récepteurs métabotropes au glutamate (famille C), les récepteurs d'adhésion (famille D) et les récepteurs Frizzled/Taste2 (famille D) (Fredriksson et al., 2003). Ils possèdent sept domaines transmembranaires, trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Leur activation par leur ligand va induire différentes cascades de signalisation dépendantes des protéines G associées au récepteur, entraînant notamment des variations de calcium et modulant ainsi la sécrétion de neurotransmetteurs [Figure 37].

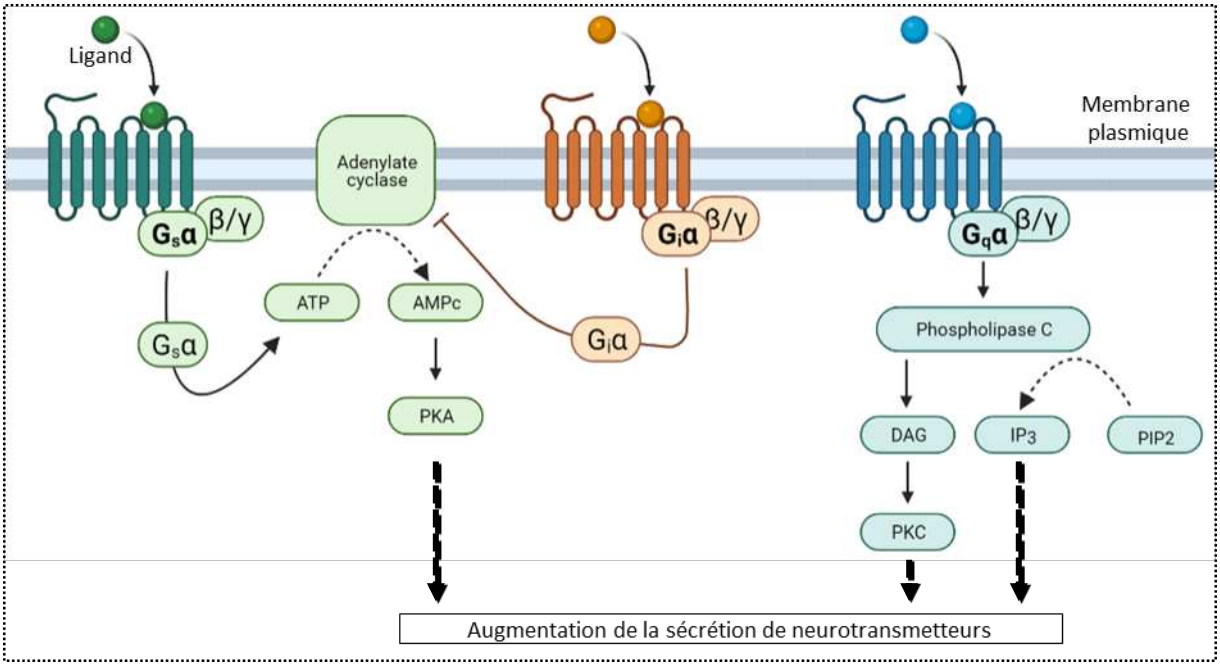


Figure 37 – Voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Représentation schématique des voies de signalisation induites suite à l'activation des récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ par leur ligand.

Parmi les systèmes de neurotransmission précédemment décrits, de nombreux récepteurs modulés dans la MA sont des RCPG. Ces récepteurs et leur protéine G canonique sont listés dans le tableau 7 ci-après :

	Récepteurs	Protéine G principalement associée
Système cholinergique	M1, M3, M5	Gαq
	M2, M4	Gαi
Système glutamatergique	mGluR1, mGlur5	Gαq
	mGluR2-4, mGluR6-8	Gαi
Système sérotoninergique	5-HT_2	Gαq
	5-HT_1, 5-HT_5	Gαi
	5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7	Gαs

Tableau 7 – Récepteurs couplés aux protéines G dont la fonction est altérée dans la MA et couplage canonique

D'après Caulfield 1993; McCorvy and Roth 2015; Niswender and Conn 2010.

iv. Epigénétique

Des études chez la levure *Caenorhabditis elegans* ont montré que de nombreux facteurs épigénétiques sont impliqués dans le vieillissement (P et al., 2016). Ces études ont par la suite été étendues à des maladies telles que la MA, où il a été observé une altération de l'acétylation des histones, dont le rôle dans les processus mnésiques a été démontré (Gräff & LH, 2013). Le marqueur H4K16ac, correspondant à l'acétylation du résidu lysine en position 16 de l'histone H4, mais également les marqueurs H3K27ac et H3K9ac sont perturbés dans le cerveau des patients atteints de la MA avec une diminution d'H4K16ac à proximité des gènes liés au vieillissement et à la MA, et une augmentation d'H3K27ac et H3K9ac (Nativio et al., 2018, 2020). De même, il a été observé une augmentation du taux des HDAC, responsables de la désacétylation des histones. Ces perturbations ont donc suggéré de nouvelles pistes thérapeutiques proposant notamment l'utilisation d'inhibiteurs des HDAC (Wood, 2018) ou d'activateurs des histones acétyltransférases, tels que le CSP-TTK21. Trois injections de CSP-TTK21, à raison d'une par semaine, empêchent les déficits cognitifs, et une injection est suffisante pour prévenir les pertes synaptiques présentes dans le modèle murin Thy-Tau22 C57BL/6J (Chatterjee et al., 2018). Un essai clinique dont l'objectif est d'identifier des biomarqueurs épigénétiques des formes sporadiques de la MA est en cours (NCT04081285).

3. Les modèles précliniques murins de la maladie d'Alzheimer

a. Les modèles de première génération - les modèles transgéniques

De nombreux modèles transgéniques ont été générés afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la physiopathologie de la MA et de tester l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques. Les principaux modèles, listés de manière non-exhaustive dans le tableau 8, expriment les transgènes APP ou Tau humains portant des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA (Duyckaerts et al., 2008; Mullane & Williams, 2019; Sasaguri et al., 2017). De manière générale, les modèles portant uniquement l'un des deux transgènes présentent l'un des versants de la physiopathologie (pathologie amyloïde ou Tau), mais ne réunissent pas l'ensemble des caractéristiques de la maladie. Des modèles portant les deux transgènes ont ainsi été générés et présentent une pathologie plus proche de la MA.

Cependant, ces modèles transgéniques portent des mutations familiales de la MA et ne représentent donc pas les formes sporadiques qui sont les plus représentatives en population générale. D'autre part, ces transgènes sont surexprimés, induisant dans le cas de l'APP une surproduction des différents fragments découlants à son clivage, ce qui peut engendrer des phénotypes qui ne sont pas liés à la MA (Sasaguri et al., 2017).

b. Les modèles de seconde génération - les modèles *knock-in*

Des modèles *knock-in* où la séquence endogène murine de l'APP ou de Tau a été remplacée par la séquence humaine ont été générés afin d'éviter la surexpression des transgènes. Cependant, en absence de mutations sur les séquences humaines, ces modèles ne développent pas de pathologie amyloïde ou Tau (Mucke et al., 2000; Saito et al., 2019). Les modèles APP^{NL-F} ou APP^{NL-G-F} ont ainsi été générés portant respectivement les mutations familiales Swedish et Iberian, ou Swedish, Arctic et Iberian (Saito et al., 2014) ; ainsi que plusieurs modèles portant le gène codant pour le protéine Tau humaine mutée (Watamura, 2020).

c. Les modèles d'injections aigues

Des modèles d'injection intracérébrale d'oligomères amyloïdes ont également vu le jour, notamment *via* l'injection d'oligomères $A\beta_{40/42}$ et $A\beta_{25/35}$ qui entraîne de nombreuses altérations présentes dans la MA telles qu'une augmentation de la gliose, du stress oxydatif,

des altérations cognitives et une altération de l'homéostasie de l'acétylcholine (Klein et al., 1999; Zussy et al., 2011). L'injection d'homogénats de cerveaux de patients, ayant permis de développer les hypothèses de propagation « *prion-like* » des peptides amyloïdes et Tau, est également en capacité d'engendrer une pathologie représentative de la MA (Hérard et al., 2020; Robert et al., 2021). De telles injections représentent l'avantage de reproduire l'ensemble des altérations protéiques, amyloïde et Tau, altérées dans la MA.

	Transgène(s)	Promoteur	Nom du modèle	Nom/details des mutations familiales
Transgénique pour APP	APP	PDGFβ	J20	KM670/671NL (Swedish) V717F (Indiana)
		Thy1	APP23	KM670/671NL (Swedish)
		Prion	Tg2576	KM670/671NL (Swedish)
Transgénique pour Tau	MAPT	Thy1.2	Thy-Tau22	G272V P301S
		Thy1	hTau.P301S	P301S
		Prion	JNPL3	P301L
Double transgénique	APP MAPT	Prion	APPswe/Tau	APP : KM670/671NL (Swedish) MAPT : P301L
	APP PSEN1	Prion	APP/PS1	APP : KM670/671NL (Swedish) PSEN1 : deltaE9
		Thy1	APP/PS1-21	APP : KM670/671NL (Swedish) PSEN1 : L166P
		Thy1	5XFAD	APP : KM670/671NL (Swedish), I716V (Florida), V717I (London) PSEN1 : M146L, L286V
Triple transgénique	APP MAPT PSEN1	Thy1.2	3xTg-AD	APP : KM670/671NL (Swedish) MAPT : P301L PSEN1 : M146V
		Prion Thy1	ADLP^{APT}	Croisement 5XFAD et JNPL3

Tableau 8 – Liste non-exhaustive des modèles murins transgéniques générérés pour modéliser la MA

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la MA. Seuls des traitements, dits symptomatiques, qui ralentissent l'apparition des symptômes et améliorent la qualité de vie des patients sont disponibles. Ces traitements peuvent être regroupés en deux catégories : les inhibiteurs cholinestérasiques avec le donépézil (Aricept®), la galantamine (Reminyl®) et la rivastigmine (Exelon®), d'une part, et les antagonistes partiels des récepteurs NMDA avec la mémantine (Ebixa®), d'autre part. Néanmoins, de nombreuses recherches ont pour objectif le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant les mécanismes physiopathologiques de la MA dans le cerveau.

4. Stratégies thérapeutiques « centrales »

Les stratégies thérapeutiques ont pour objectif de développer des traitements afin de diminuer les symptômes de la pathologie, appelés « *symptom-reducing drugs* » et/ou d'agir au niveau des mécanismes physiopathologies sous-jacents, appelés « *disease-modifying drugs* ». Le Dr. J. Cummings a récemment illustré l'ensemble des agents actuellement en essais cliniques et leur action sur différentes cibles d'intérêt pour traiter la MA [Figure 38]. Certains de ces candidats-médicaments seront mentionnés dans les parties à venir.

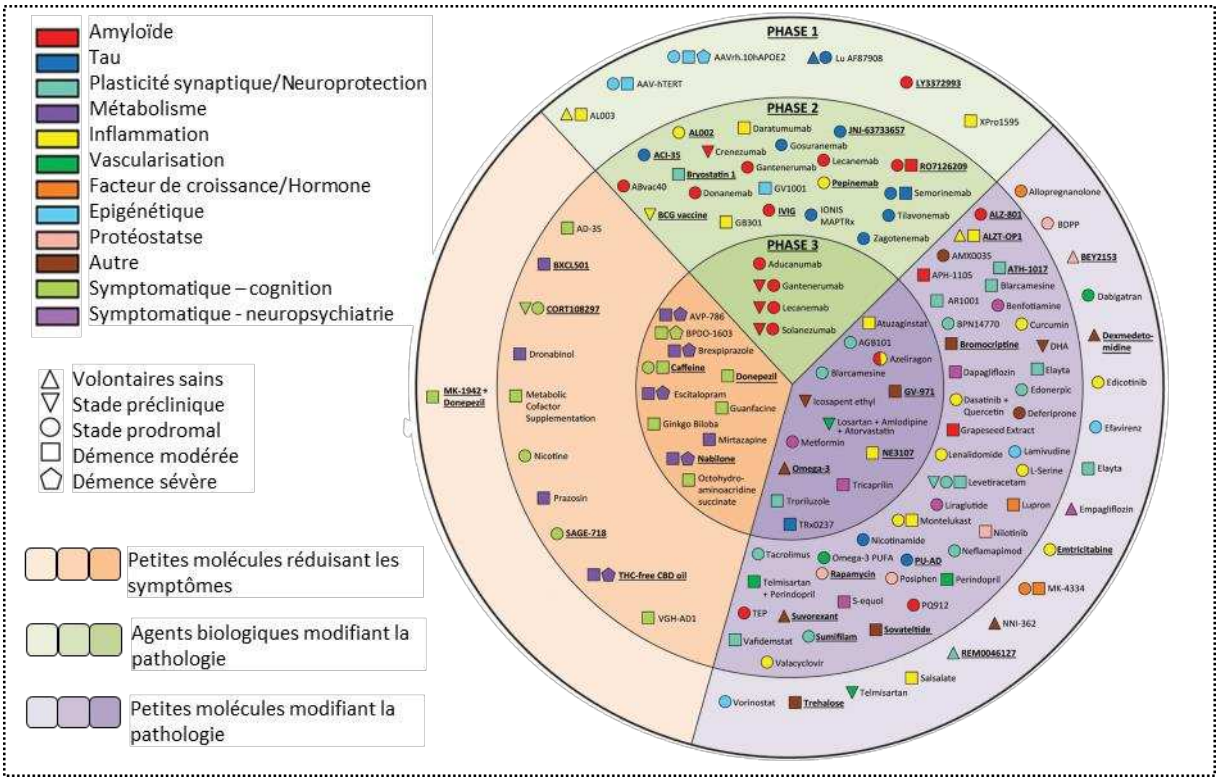


Figure 38 – Agents en essais cliniques pour traiter la maladie d'Alzheimer en 2021

Schéma adapté de Cummings et al. 2021 présentant l'ensemble des agents en phase 3 (cercle intérieur), phase 2 (cercle intermédiaire) et phase 1 (cercle extérieur) afin de traiter la maladie d'Alzheimer.

a. Pathologie amyloïde

i. Métabolisme de l'APP

Les complexes protéiques de la β- et γ- sécrétases étant impliqués dans la génération de l'Aβ, de nombreux inhibiteurs de ces enzymes ont été développés (J. Zhao et al., 2020). Cependant, de par leurs nombreux substrats essentiels pour un bon fonctionnement cérébral, aucun composé n'a été validé lors des essais cliniques. Une alternative a été le développement non pas d'inhibiteurs mais de modulateurs, notamment de la γ-sécrétase appelés GSM (*γ-secretase modulator*). Ces GSM n'affectent pas les fonctions protéolytiques de l'enzyme, mais déplacent son site de clivage sur l'APP en favorisant la production de peptides $A\beta_{37}$ et $A\beta_{38}$ qui sont non-toxiques, au détriment des peptides $A\beta_{42}$. Un nouveau GSM a récemment été développé qui présente des effets prometteurs : un traitement chronique de trois mois, démarrant avant ou après l'apparition des plaques amyloïdes dans les modèle murins transgéniques J20 et Tg2576 de la MA, est en capacité de diminuer le taux d'$A\beta_{42}$ par comparaison à des souris contrôles (Rynearson et al., 2021).

Par ailleurs, la Meprin-β étant capable de produire des peptides $A\beta_{42}$, son inhibition/modulation pourrait présenter un intérêt thérapeutique. Cependant, cette enzyme étant également impliquée dans l'activation de l'ADAM10, son inhibition entraînerait une diminution du clivage non-amyloïdogène de l'APP (Jefferson et al., 2013).

L'α-sécrétase constitue également une cible thérapeutique afin de favoriser le clivage de l'APP selon la voie non-amyloïdogène et prévenir la production de peptides amyloïdes. Les rétinoïdes, provenant du métabolisme de la vitamine A, naturels tels que l'acide rétinoïque ou synthétiques tels que l'acitrétine sont en capacité d'augmenter l'expression de l'ADAM10 stimulant ainsi la voie non-amyloïdogène (Tippmann et al., 2009). De même, des composés tels que la resvératrol permettant l'expression de la Sirtuine 1, ou une implémentation en mélatonine modulent positivement l'ADAM10 (Peron et al., 2018). D'autres composés naturels ou synthétiques permettant la modulation de l'ADAM10 font l'objet d'essais cliniques : le Sunphenon®, un polyphénol synthétique (NCT00951834) et la Bryostatin-1 (NCT04538066) (Manzine et al., 2019).

ii. Anti-agrégants

Les oligomères amyloïdes étant plus toxiques que les plaques amyloïdes, des composés naturels ou synthétiques empêchant l'agrégation des monomères ou neutralisant les oligomères ont été développés mais n'ont pas montré une efficacité significative en essai clinique (Giorgetti et al., 2018) :

- Les tétracyclines synthétiques, utilisées en premier lieu comme antibiotiques, telles que la doxycycline et la minocycline (Balducci & Forloni, 2019; Familian et al., 2006; Howard et al., 2020).
- Les composés naturels tels que les polyphénols avec la curcumine, le resvératrol et la quercétine (Colizzi, 2019; Porat et al., 2006), ou encore l'homotaurine (ou tramiprosate) extraite des algues (Aisen et al., 2011; Gervais et al., 2007) .
- Les peptides synthétiques appelés « casseurs de feuillet-β » et possédant une séquence similaire aux peptides Aβ (W. Liu et al., 2017). Un essai clinique de phase I (NCT04711486) évalue actuellement, chez des patients atteints de MCI lié à la MA, la sécurité du PRI002 (PRIAVOID), un peptide de 12 acides aminés qui en le liant à l'$A\beta_{42}$, stabilise la forme monomérique et empêche la formation d'oligomères. L'administration par voie orale a des sujets sains a montré son innocuité (Kutzsche et al., 2020).

iii. Immunothérapie

D'autres recherches se sont concentrées sur la clairance des peptides amyloïdes par des techniques d'immunisation active ou passive correspondant respectivement à l'injection d'un fragment ou à la séquence entière d'un peptide Aβ dont la capacité pathogénique est éliminée ou atténuée, et à l'injection d'anticorps dirigés contre l'Aβ (Cacabelos, 2019; Mantile & Prisco, 2020).

Le vaccin AN1792, correspondant à une immunisation active avec un peptide $A\beta_{42}$ pré-agrégé synthétique associé à l'adjuvent QS21, a été arrêté en essai clinique de phase II en raison du développement d'une méningo-encéphalite par 6% des patients (Holmes et al., 2008). Cependant, malgré cet effet secondaire majeur, le suivi *post-mortem* d'une vingtaine de participants, 14 ans après l'immunisation, a permis de mettre en évidence une élimination quasi-totale des plaques amyloïdes, ainsi qu'une corrélation négative significative entre le taux d'anticorps plasmatique anti-AN1792 et le taux de plaques amyloïdes (Nicoll et al., 2019).

Cette analyse permet de montrer l'effet bénéfique persistant d'une immunisation active et encourage le développement de vaccins de seconde génération actuellement en essais cliniques.

En parallèle, des immunisations passives ont été développées qui permettent de contourner les problèmes de variabilité interindividuelle quant à la réponse immunitaire engendrée. Actuellement, quatre anticorps sont évalués dans des essais cliniques de phase 3 : l'aducanumab, le lecneumab (BAN2401), le gantenerumab, et le solanezumab [Figure 38]. Les effets de l'aducanumab (Biogen) ont fait l'objet de nombreuses controverses : les deux essais cliniques de phase III ENGAGE (NCT02477800) et EMERGE (NCT02484547) menés par Biogen ont été arrêtés prématurément par manque de preuve d'efficacité. Une analyse a posteriori a montré une réduction de 23% du déclin cognitif a pu être mis en évidence chez les patients traités précocement dans l'essai EMERGE qui n'a pas été validée dans l'essai ENGAGE. Après une reprise des essais avec une augmentation du dosage, la FDA a délivré une autorisation accélérée de mise sur le marché Américain sous le nom Adulhem le 7 Juin 2021. Cette autorisation se base sur la nette diminution de la charge amyloïde dans le cerveau des patients mesurée en imagerie qui serait prédictive d'une efficacité thérapeutique. Néanmoins, un essai post-approbation a été demandé à Biogen pour valider le bénéfice clinique pour les patients atteints de MA. Le coût de ce traitement et l'existence de possibles effets indésirables nécessitant une surveillance médicale laissent présager une utilisation compliquée de ce médicament.

b. Pathologie Tau

De manière similaire à la pathologie amyloïde, de nombreuses stratégies thérapeutiques contre la pathologie Tau ont été développées (Jadhav et al., 2019).

i. Inhibition de l'hyperphosphorylation Tau

La kinase GSK-3β et la phosphatase PP2A sont les deux enzymes clés impliquées dans l'état de phosphorylation de Tau. Un inhibiteur de la GSK-3β, le Tideglusib, a donc été développé mais n'a pas prouvé son efficacité thérapeutique (Ser et al., 2013). Les OGA régulant positivement la phosphorylation de Tau, des inhibiteurs de ces enzymes, l'ASN120290 et le LY3372689, sont en cours d'évaluation (Kielbasa et al., 2020; Ryan et al., 2018).

ii. Anti-agrégants

L'anti-agrégant de Tau le plus connu est le bleu de méthylène, également connu sous le nom de chloride de methylthionine, ou CMT, et fut l'objet d'essais cliniques qui n'ont pas donné de résultats probants. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le CMT inhibe la formation des fibrilles de Tau, augmentant ainsi la quantité d'oligomères qui sont neurotoxiques (Soeda et al., 2019). Une seconde génération d'anti-agrégant a ainsi vu le jour, l'hydromethylthionine, mais les effets bénéfiques n'ont à nouveau pas été prouvés (Hashweh et al., 2020). Le TRx0237 (LMTX) une nouvelle formulation du CMT est toujours disponible en essai de phase 3, en extension pour les patients ayants participé aux essais précédents.

iii. Immunothérapie

L'immunothérapie reste à ce jour la stratégie thérapeutique contre la pathologie Tau la plus avancée et prometteuse. En effet, les vaccins AADvac-1 (Novak et al., 2021) et AIC-35 (NCT04445831) sont actuellement en essais cliniques de phase II. Plusieurs anticorps ont ainsi été développés et menés jusqu'en phase II tel que le Gosuranemab (NCT03352557), le JNJ-63733657 (NCT04619420), le Tilavonemab (NCT03712787), le Semorinemab (NCT03828747) et le Zagotenemab (NCT03518073). Cependant, Biogen, menant l'essai clinique TANGO sur le Gosuranemab a récemment annoncé que le traitement ne présente aucune efficacité.

iv. Reduction de Tau

Une autre approche thérapeutique repose sur l'utilisation d'oligonucléotide antisens, ou OAS. Ces deniers correspondent à de courtes séquences nucléotidiques pouvant induire la dégradation de l'ARNm du gène d'intérêt, ou augmenter ou diminuer sa traduction (Bennett et al., 2019). Dans le cadre de la MA, des OAS tels que l'IONIS-MAPTRx ont été développés afin de réduire le taux de la protéine Tau (Mignon et al., 2018).

c. Anti-oxydants et chélateurs de métaux

Pour lutter contre le stress oxydant, de nombreux antioxydants naturels ont été étudiés tels qu'une supplémentation en vitamine B, C, E ou en sélénium (Fillenbaum et al., 2005; Kryscio et al., 2017; D.-M. Zhang et al., 2016). De même, la caféine a longtemps été l'objet de nombreuses questions concernant son potentiel effet bénéfique pour la MA. En effet, elle présente des effets anti-oxydants et est également un antagoniste non-sélectif des récepteurs A_{2A}

microgliales (Ikram et al., 2020). Un essai clinique de phase 3 va prochainement évaluer l'efficacité de la caféine sur la cognition dans la MA (NCT04570085).

La dérégulation de l'homéostasie métallique observé chez les patients atteints de la MA a inspiré le développement de chélateurs de métaux tels que le PTB2 qui a démontré des effets prometteurs en essai clinique de phase II et dont l'efficacité va être étudiée à plus large échelle (Faux et al., 2010; Lannfelt et al., 2008).

d. Neuroinflammation

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non-stéroïdiens (AINS) ont été évalués pour leur potentiel thérapeutique à réduire une neuroinflammation chronique mais n'ont montré aucune efficacité clinique (Aisen et al., 2000; Ali et al., 2019). Parmi les AINS, le Diclofénac semble tout de même exercer des effets encourageants (Stuve et al., 2020). Par ailleurs, les AIS tels que la prednisone, un glucocorticoïde de synthèse, ont aggravé le déclin cognitif des patients, suggérant ainsi le développement de modulateurs des récepteurs aux glucocorticoïdes comme nouvelle piste thérapeutique (Canet, Chevallier, et al., 2018).

e. Neurotransmission

Neurotransmission cholinergique

Le système cholinergique étant le principal système de neurotransmission altéré dans la MA, cela a conduit à privilégier le développement de composés permettant de restaurer le taux d'ACh cérébral : les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE - enzyme responsable de la dégradation de l'ACh). L'AChE possède deux sites de liaisons qui permettent d'inhiber son activité d'hydrolyse : le site catalytique, ou CAS (*catalytic active site*) et le site actif périphérique, ou PAS (*peripheral active site*). Parmi les inhibiteurs de l'AChE actuellement sur le marché, la rivastigmine se lie au CAS, et le donépézil et la galantamine aux deux sites (Bar-On et al., 2002; Pilger et al., 2001; Takahashi et al., 2019). La fixation de ces composés au PAS apporte également un effet bénéfique en raison de son implication dans la formation des fibrilles d'Aβ (Inestrosa et al., 1996). Ce rôle est confirmé par le fait que la butyrycholinestérase (BChE), permettant également l'hydrolyse de l'ACh et ne possédant pas ce PAS, n'affecte pas la formation d'amyloïde. Par ailleurs, des inhibiteurs de BChE, ce qui est également le cas de la rivastigmine, ont démontré avoir des effets bénéfiques dans des modèles précliniques murins de la MA (Greig et al., 2005; Weinstock, 2012).

Neurotransmission glutamatergique

L'excitotoxicité majeure due à l'accumulation de glutamate dans l'espace synaptique ont mené au développement d'antagonistes des récepteurs NMDA. C'est le cas de la mémantine, actuellement sur le marché. Récemment, un nouvel antagoniste des récepteurs NMDA, le RL-208, a montré des effets bénéfiques pour ralentir le déclin cognitif dans un modèle murin de senescence (Companys-Alemany et al., 2020). Les agonistes des récepteurs AMPA tel que le LY451395 n'ont pas montré d'efficacité thérapeutique (Chappell et al., 2007).

Neurotransmission sérotoninergique

Enfin, en ce qui concerne le système sérotoninergique, les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, ou IRS, et la modulation de l'activité des récepteurs 5-HT sont étudiés.

En ce qui concerne les IRS, l'Escitalopram, actuellement sur le marché pour traiter la dépression et l'anxiété, a permis de réduire significativement le taux d'$A\beta_{42}$ présent dans le LCS de patients cognitivement normaux *versus* placebo lors d'un récent essai clinique (Sheline et al., 2020). Son intérêt thérapeutique dans le cadre de la MA sera prochainement étudié.

Les modèles précliniques ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de ligands des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_4 et 5-HT_6 (Ramirez et al., 2014).

- L'activation du récepteur 5-HT_{1A}, couplé à une protéine $G\alpha_i$, entraîne une diminution de l'activité neuronale. Cependant son blocage par des antagonistes, tels que le lecozotan, a échoué en essai clinique de phase II en raison de l'observation de nombreux effets secondaires (Sabbagh, 2009; Schechter et al., 2005).
- Les agonistes du récepteur 5-HT_4 entraînent une augmentation de la libération d'ACh et une diminution du taux d'Aβ dans différent modèles précliniques de la MA (Giannoni et al., 2013; Tesseur et al., 2013). Cet effet sur l'accumulation d'Aβ semble provenir de l'interaction du 5-HT_4 avec l'ADAM10, promouvant de manière constitutive le clivage de l'APP selon la voie non-amyloïdogène (Cochet et al., 2013a). Le développement clinique du PRX-03140, un agoniste hautement sélectif du 5-HT_4, et ne ciblant pas les canaux potassiques hERG (*Ether-a-go-go-related gene*) cardiaques contrairement aux agonistes de première génération, présente des effets bénéfiques dans des modèles précliniques, s'est arrêté suite à un essai clinique de phase II (NCT00672945) pour raisons inconnues.

- Enfin, les antagonistes du récepteur 5-HT_6 offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ces récepteurs interagissent avec le complexe mTOR (*mammalian target of rapamycin*) dont l'activité semble augmentée dans la MA, et dont le blocage direct par la Rapamycine ou indirect par des antagonistes du récepteur 5-HT_6 entraîne une augmentation des capacités cognitives (Meffre et al., 2012). Par ailleurs, le blocage de ces récepteurs semble corriger les altérations des mécanismes de l'autophagie observées dans le cerveau des patients atteints de la MA (Oddo, 2012). Au niveau clinique, l'Idalopirdine, l'Intepirdine et le Latrepirdine ont échoué en phase III, mais un nouvel antagoniste, la Masupirdine est en cours d'évaluation en phase II (NCT02580305).

f. Thérapie multimodale

La physiopathologie de la maladie d'Alzheimer étant multifactorielle, une nouvelle approche repose sur une traitement thérapeutique multimodal permettant d'agir sur différentes cibles d'intérêt. Pour ce faire, différentes techniques sont possibles [Figure 39].

La polychimiothérapie ou MMT (*multiple-medication therapy*) correspond à la prescription de plusieurs médicaments. La MMT a fait l'objet de nombreux essais cliniques, notamment en combinant la prise de rivastigmine avec la mémantine, mais n'a apportée aucune efficacité supplémentaire à l'utilisation de traitements individuels (Choi et al., 2011; Farlow et al., 2010; Weiner et al., 2011). L'inconvénient de cette approche est la possible interaction entre les composés, et la compliance du patient sur le long terme.

Une seconde technique, appelée MCM (*multiple-compound medication*), repose sur l'utilisation de plusieurs composés combinés dans une forme galénique unique, tels que le Namzaric®, une combinaison de la mémantine et du donépézil correspondant à une co-administration des deux composés (Deardorff & GT, 2016). Cette approche permet d'éviter les défauts de compliance, mais une interaction entre les deux composés est toujours possible.

Enfin, les ligands multi-cibles, ou MTDL (*multi-target-directed ligand*), permettent d'incorporer en une seule molécule plusieurs cibles. Cette approche a l'avantage d'amoindrir les effets secondaires, d'avoir un meilleur profil pharmacocinétique et d'augmenter l'effet synergique. De telles molécules ont montré de nombreux effets prometteurs dans des modèles précliniques de la MA. Le RPEL, ayant une activité inhibitrice de l'AChE et modulant le métabolisme de l'APP, a été en capacité de diminuer la pathologie amyloïde et Tau, et de

prévenir le déclin cognitif dans le modèle murin Tau-Thy22 et le modèle amyloïde APP/PS1 de la MA (Sergeant et al., 2019). De même, le donécopride, inhibiteur de l'AChE et agoniste du récepteur 5-HT_4, a permis de prévenir le déclin cognitif dans le modèle murin 5XFAD C57BL/6 et dans un modèle aigu d'injection intrahippocampiques d'oligomères d'$A\beta_{1-42}$ chez des souris saines C57BL/6, et de réduire l'agrégation amyloïde et l'hyperphosphorylation de Tau *in vitro* (Rochais et al., 2020). Des MTDL engageant trois cibles (inhibiteur de l'AChE, agoniste du récepteur 5-HT_4 et antagoniste du récepteur 5-HT_6) sont également en cours de développement et d'évaluation en modèles précliniques (Hatat et al., 2019a).

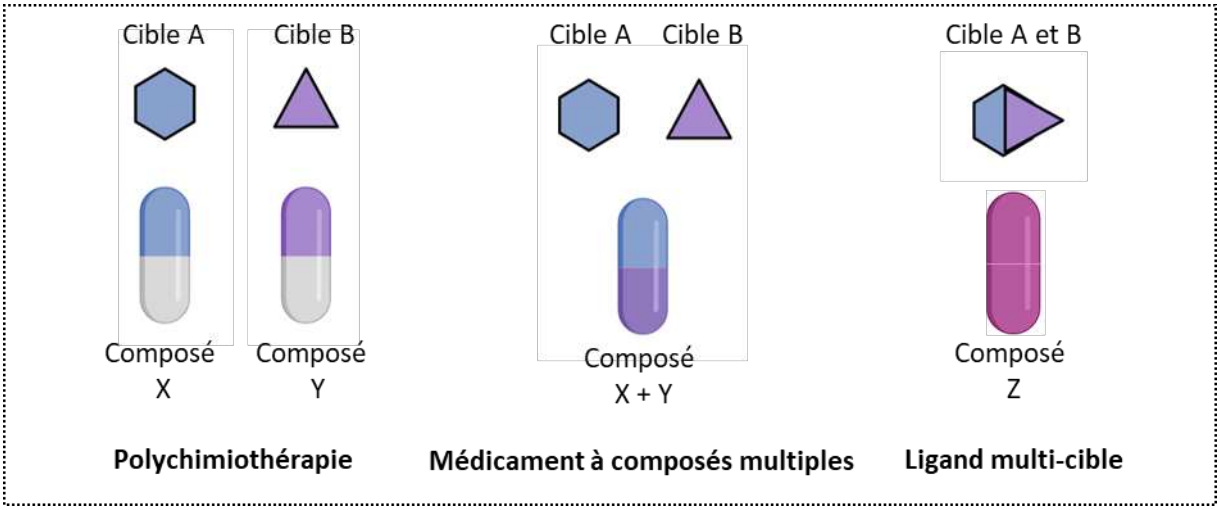


Figure 39 – Les différentes approches d'une thérapie multimodale
Représentation schématique des approches de polychimiothérapie, médicament à composés multiples et ligand multi-cible.

g. Le passage de la barrière hémato-encéphalique

Le développement de nouveaux composés pour le traitement de la MA doit faire face à une problématique majeure : le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) afin d'atteindre les cibles d'intérêts. Les traitements actuellement sur le marché sont en capacité de passer la BHE via des transporteurs organiques de cations, notamment le transporteur de la choline pour les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, et le transporteur de la carnitine pour la mémantine, un antagoniste partiel des récepteurs NMDA (Kim et al., 2010; N. Y. Lee & Kang, 2010; Mehta et al., 2013).

Cependant, le passage d'anticorps en immunothérapie pose un problème majeur qui fut intensivement étudié par le Pr. WM. Pardridge. Les essais cliniques mesurant le taux d'anticorps dans le liquide cérébrospinal (LCS) ne reflètent pas le taux de molécules ayant passé la BHE. Il a été démontré de manière générale que le ratio plasma/LCS d'IgG est

d'environ 0,2%, et le ratio plasma/cerveau est inférieur à 0,01% (Pardridge, 2020; Reiber, 2003). Cette différence est dûe à la perméabilité de la BHE qui est plus importante au niveau des plexus choroïdes, structures impliquées dans la production du LCS. Le taux réel d'anticorps pouvant agir sur leurs cibles est donc nettement moins important.

Une technique biologique semblable à un cheval de Troie, correspondant au développement d'anticorps bispécifiques, permet un meilleur passage des anticorps au travers de la BHE : un anticorps monoclonal dirigé contre des récepteurs présents sur la BHE tels que le récepteur à la transferrine (TfR), appelé TfRMAb, ou le récepteur humain à l'insuline (IR), appelé HIRMAb, est combiné à l'anticorps d'intérêt, permettant ainsi son passage via la BHE après endocytose du complexe récepteur/anticorps bispécifique (Boado et al., 2009). Cette technologie est actuellement en cours d'essai clinique (NCT04639050) afin de faciliter le passage du gantenerumab, un anticorps dirigé contre les peptides amyloïdes.

Des nanoparticules ont également été étudiées afin de faciliter le passage de composés thérapeutiques : elles peuvent être d'origine naturelle ou synthétique, et peuvent passer la BHE via des récepteurs/transporteurs membranaires, par diffusion ou par adsorption (Saraiva et al., 2016). La piste de nanoémulsions combinée à des hydrogels mucoadhésifs permettant une administration par voie intranasale où le passage vers le cerveau est facilité (Crowe et al., 2018) est également une piste prometteuse (Yang et al., 2013).

La BHE des personnes atteintes de la MA étant altérée, cela peut laisser penser qu'une augmentation du passage des composés thérapeutiques est possible en comparaison à des personnes saines. Cependant, cette altération pathologique peut diminuer le taux des composés atteignant le cerveau en raison de la dégénérescence des cellules endothéliales, de la diminution de l'expression des protéines de transports et de l'accumulation de débris au niveau périvasculaire (Sweeney et al., 2018).

La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques pouvant contourner les problèmes liés au passage de la BHE présente donc des avantages.

5. Stratégies thérapeutiques « périphériques »

La MA étant considérée comme une pathologie cérébrale, les efforts de développement thérapeutiques se sont concentrés sur le SNC. Cependant, la découverte de l'axe microbiote intestinal–cerveau et de son implication dans l'homéostasie cérébrale et dans différents désordres cérébraux incite les chercheurs à étudier d'avantage le microbiote intestinal dans le contexte de la MA. Cela permet d'approfondir nos connaissances et d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et la progression de la pathologie, et ainsi d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

a. Microbiote intestinal et maladie d'Alzheimer chez le rongeur

i. Preuves de concept

Les modèles précliniques de la MA présentent une dysbiose du microbiote intestinal. Une absence de microbiote intestinal (souris axéniques) ou une modulation de sa composition a permis de mettre en évidence son implication dans la physiopathologie de la MA. En effet, un traitement antibiotique est en capacité de diminuer la pathologie amyloïde et la neuroinflammation dans trois modèles murins d'amyloïdose (APP/PS1 C57BL/6-C3H, APP/PS1-21 C57BL/6Cj et 5XFAD C57BL/6J) (Dodiya et al., 2019; Guilherme et al., 2021; Minter et al., 2017) [Figure 40].

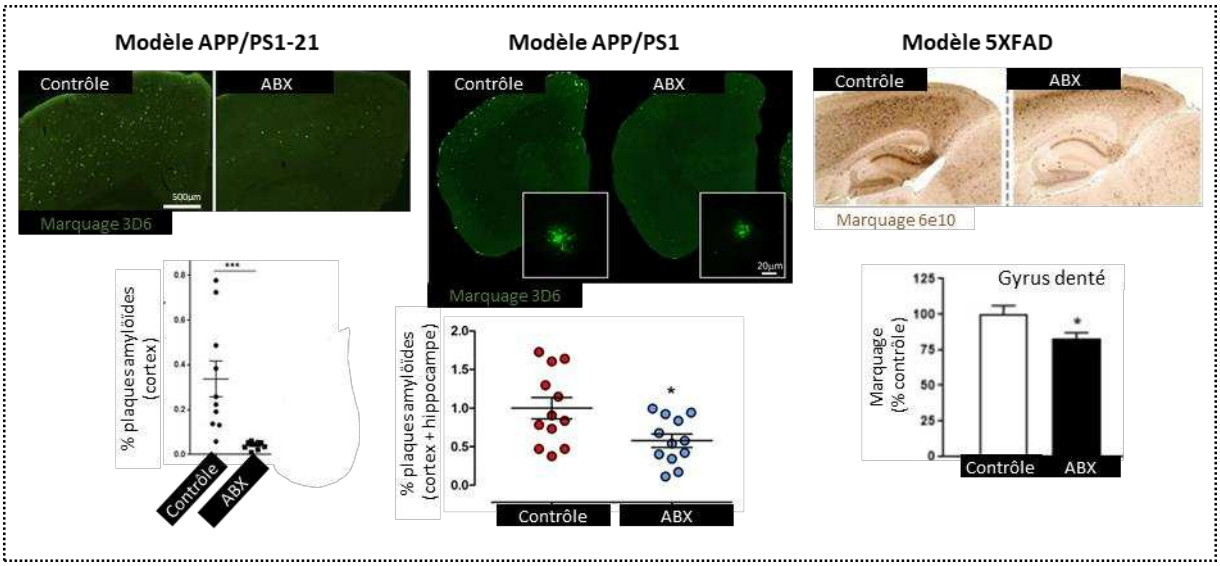


Figure 40 - Diminution de la pathologie amyloïde après traitement antibiotique dans trois modèles murins
Un traitement antibiotique diminue la pathologie amyloïde dans les modèles murins APP/PS1-21, APP/PS1 et 5XFAD. Analyses en microscopie des plaques amyloïdes (marquages 3D6 ou 6E10) et leurs quantifications dans différentes régions cérébrales (cortex, hippocampe, gyrus denté). D'après Dodiya et al. 2019; Guilherme et al. 2021; Minter et al. 2017. ABX = antibiotique.

Il est intéressant de noter que ces traitements antibiotiques ne semblent effectifs que chez les mâles. En effet, dans le même paradigme, aucune amélioration n'est observée chez les femelles APP-PS1 (Dodiya et al., 2019). Par ailleurs, chez des souris axéniques APP/PS1 une réduction drastique des dépôts amyloïdes est observée. La recolonisation de ces animaux axéniques avec du microbiote intestinal de souris conventionnelles conduit à une augmentation de la pathologie amyloïde cérébrale, cette augmentation étant encore plus importante si le microbiote administré provient de souris APP/PS1 élevées en environnement conventionnel (Harach et al., 2017) [Figure 41].

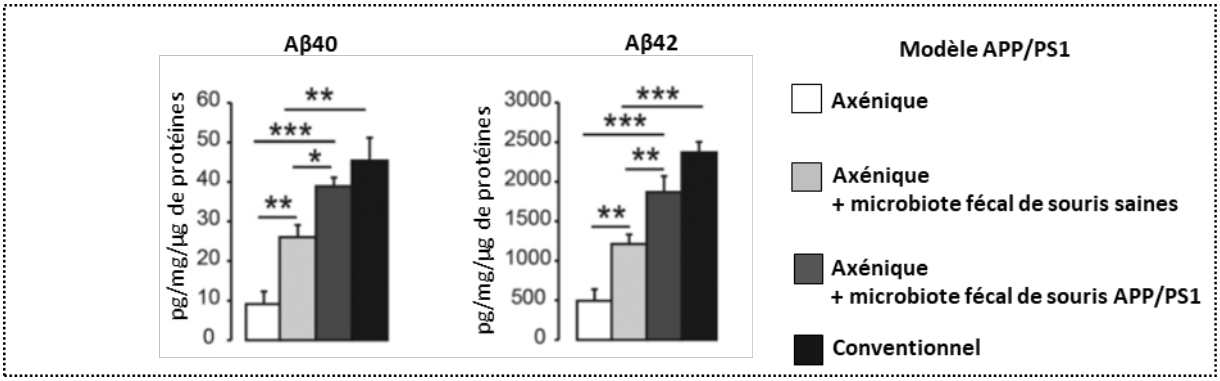


Figure 41 – Modulation de la pathologie amyloïde chez des souris après transplantation de microbiote fécal
La colonisation avec du microbiote fécal provenant de souris modèle APP/PS1 aggrave la pathologie amyloïde chez des souris modèle APP/PS1 axénique en comparaison à du microbiote de souris saines. Quantification par ELISA des taux d'Aβ$_{40}$ et Aβ$_{42}$ solubles cérébraux. D'après Harach et al. 2017.

L'administration de probiotiques a également permis une amélioration de la pathologie dans des modèles précliniques de MA. L'administration de *Bifidobacterium breve* quotidiennement durant 11 jours prévient les déficits cognitifs et diminue l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation au niveau hippocampique dans un modèle d'injection d'oligomères d'Aβ chez la souris (Kobayashi et al., 2017). Un cocktail de probiotiques contenant les espèces *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium longum* permet de prévenir les déficits cognitifs, restaure les défauts de plasticité synaptique et diminue le stress oxydant dans un modèle d'injection d'Aβ chez la souris (Rezaei Asl et al., 2019). L'administration de l'espèce *Bifidobacterium longum* 6 fois par semaine durant 8 semaines diminue le taux de LPS fécal et sanguin, diminue la perméabilité intestinale au niveau du colon et réduit les dépôts hippocampiques d'Aβ dans le modèle de souris 5XFAD C57BL/6SJL (H.-J. Lee et al., 2019). Enfin, la transplantation de microbiote fécal provenant de souris saines est en capacité de ralentir la progression de la pathologie dans différents modèles. Dans le modèle de souris APP/PS1 âgées de 6 mois une amélioration des performances cognitives, une réduction des

plaques amyloïdes, de la phosphorylation de Tau, du taux d'$A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$, et une augmentation de la plasticité synaptique est observée après administration de microbiote fécal de souris naïves de même âge (Sun et al., 2019). Dans le modèle de souris 5XFAD, les chercheurs observent une amélioration de la mémoire et une diminution des dépôts Aβ après transplantation de microbiote intestinal de souris saines (Holsinger & Elangovan, 2020).

De même, dans un modèle murin récemment développé appelé $ADLP^{APT}$ C57BL/6SJL (D. K. Kim et al., 2018) et présentant une pathologie amyloïde et Tau, ainsi qu'une perte de l'intégrité de la barrière intestinale associée à une inflammation chronique, une transplantation de microbiote sain a permis de réduire la neuroinflammation, la formation des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires, et d'améliorer les performances cognitives. Par ailleurs, les altérations de l'expression de gènes liés à l'activité des macrophages intestinaux ont été corrigées (Kim et al., 2020).

Une étude très récente de l'équipe du Dr. JF. Cryan montre que le transfert chronique de microbiote intestinal de souris de 3-4 mois d'âge protège contre l'apparition de certains déficits comportementaux chez les souris âgées de 19-20 mois. Cette transplantation fécale corrige certaines altérations immunitaires centrales et périphériques liées à l'âge et notamment normalise les taux de cellules dendritiques ou d'IL-10 circulante et l'inflammation microgliale (Boehme et al., 2021).

ii. Humanisation

Nous avons vu dans les chapitres précédents que le transfert de microbiote humain pathologique à des souris saines permettait d'induire des modifications biochimiques et de conférer des comportements synonymes d'un état pathologique chez les animaux. C'est ainsi le cas pour les désordres métaboliques, diabète, obésité ou maladie alcoolique du foie (Llopis et al., 2016; Ridaura et al., 2014), mais également pour les maladies neurologiques telles que la schizophrénie et la maladie de Parkinson (Sampson et al., 2016; Zhu et al., 2020). De telles études d'humanisation de modèles murins n'ont pas encore été réalisées pour la MA.

b. Microbiote intestinal et maladie d'Alzheimer en clinique humaine

i. Caractérisation bactérienne

A ce jour, huit études ont caractérisé le microbiote bactérien fécal de patients atteints de la MA (Cattaneo et al., 2017; Guo et al., 2021; Haran et al., 2019; B. Li et al., 2019; Ling, Zhu, Yan, et al., 2020; P. Liu et al., 2019; Vogt et al., 2017; Z.-Q. Zhuang et al., 2018) et d'autres essais cliniques sont actuellement en cours (NCT03487380, NCT03827733, NCT04081285, NCT04100889, NCT04606420, NCT04841135) pour étendre la caractérisation du microbiote intestinal. Les altérations observées sont résumées dans le tableau 9.

Brièvement, les principaux phyla bactériens Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria sont modulés. Au niveau des familles, il y a une augmentation des *Enterococcaceae* et une diminution des *Clostridiaceae* et *Lachnospiraceae*, avec également une modulation des *Bacteroidaceae*, *Bifidobacteriaceae* et *Ruminoccocaceae*. Au niveau des genres bactériens, *Akkermansia* et *Diaslister* se trouvent respectivement augmentés et diminués. *Alistipes*, *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Bifidobacterium*, *Blautia* et *Prevotella* se retrouvent également modulés d'après plusieurs études. Il est intéressant de noter l'altération de l'espèce *Bacteroidetes-fragilis*, connue pour moduler le système immunitaire via le LPS et le PSA (polysaccharide A) qui le compose, ainsi que l'augmentation du genre *Akkermansia* dont l'abondance varie dans d'autres pathologies cérébrales.

Il faut cependant préciser que les analyses de la composition du microbiote dans les études du Dr. A. Catteneo et JP. Haran ont été réalisées par métagénomique globale, dit séquençage « shotgun », et les autres études citées par métagénomique ciblée des régions V3-V4 du gène de l'ARN16S. Cette dernière méthode ne permet de séquencer qu'une partie du microbiote intestinal. En effet, le séquençage "shotgun" est plus performant dans l'identification d'OTU qui sont peu abondants et permet une classification au niveau de la souche (Durazzi et al., 2021). Cette technique permet aussi d'avoir accès à l'ensemble des gènes bactériens et de spécifier leur fonction, mais également de ne pas se limiter au séquençage des populations bactériennes.

	Augmenté	Diminué
Phylum	Actinobacteria Bacteroidetes Proteobacteria	Actinobacteria Bacteroidetes **Firmicutes**
Famille	*Bacteroidaceae* *Bifidobacteriaceae* *Coriobacteriaceae* *Corynebacteriaceae* ***Enterococcaceae*** *Erysipelotrichaceae* *Gemellaceae* *Lactobacillaceae* *Rikenellaceae* *Ruminococcaceae* *Verrucomicrobiaceae*	*Bacteroidaceae* *Bifidobacteriaceae* ***Clostridiacaea*** ***Lachnospiraceae*** *Mogibacteriaceae* *Peptostreptococcaceae* ***Ruminococcaceae*** *Turicibacteraceae* *Veillonellaceae*
Genre	*Acinetobacter* ***Akkermansia*** ***Alistipes*** ***Bacteroides*** *Barnesiella* ***Bifidobacterium*** *Bilophila* ***Blautia*** *Escherichia* *Dorea* *Gemella* *Lactobacillus* *Odoribacter* *Phascolarctobacterium* *Prevotella* *Shigella* *Streptococcus*	*Adlercreutzia* *Alistipes* *Alloprevotella* ***Bacteroides*** *Barnesiella* *Bifidobacterium* *Blautia* *Butyricicoccus* *Butyricimonas* *cc115* *Clostridium* *Coprococcus* ***Dialister*** *Faecalibacterium* *Gemmiger* *Haemophilus* *Lachnoclostridium* *Lachnospira* *Parabacteroides* *Paraprevotella* *Prevotella* *Romboutsia* *Roseburia* *Ruminoclostridium* *Ruminococcus* *SMB53* *Succinivibrio* *Sutterella* *Turicibacter*
Espèce	*Bacteroides-dorei* *Bacteroides-fragilis* *Bacteroides-vulgatus* *Eggerthella-lenta* *Klebsiella-pneumoniae* *Odoribacter-splanchnicus*	***Bacteroidetes-fragilis*** *Blautia-hansenii* *Butyrivibrio-hungatei* *Eubacterium-eligens* *Eubacterium-rectale* *Faecalibacterium-prausnitzii* *Roseburia-hominis* *Ruminococcus-bicirculans*

Tableau 9 - Altérations bactériennes du microbiote intestinal dans la maladie d'Alzheimer

Ce tableau résume les augmentations (en rouge) et diminutions en (vert) bactériennes intestinales retrouvées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer par comparaison à des sujets contrôles.
Certaines études décrivent des abondances bactériennes contradictoires (soulignées) ou similaires (en gras).

Ces études démontrent la présence d'une dysbiose intestinale bactérienne chez les patients atteints de la MA. Ces altérations, qui ne sont pas toujours en accord selon les études, permettent d'attirer l'attention sur certaines bactéries dont l'abondance se retrouve modulée dans la MA et dans au moins une autre pathologie neurologique précédemment décrite (Chapitre II.3) : les familles bactériennes *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillacea*, *Ruminococcaceae* et *Verrucomicrobiaceae* ; les genres bactériens *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Bilophila*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* et *Streptococcus*, ainsi que l'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii* [Figure 42].

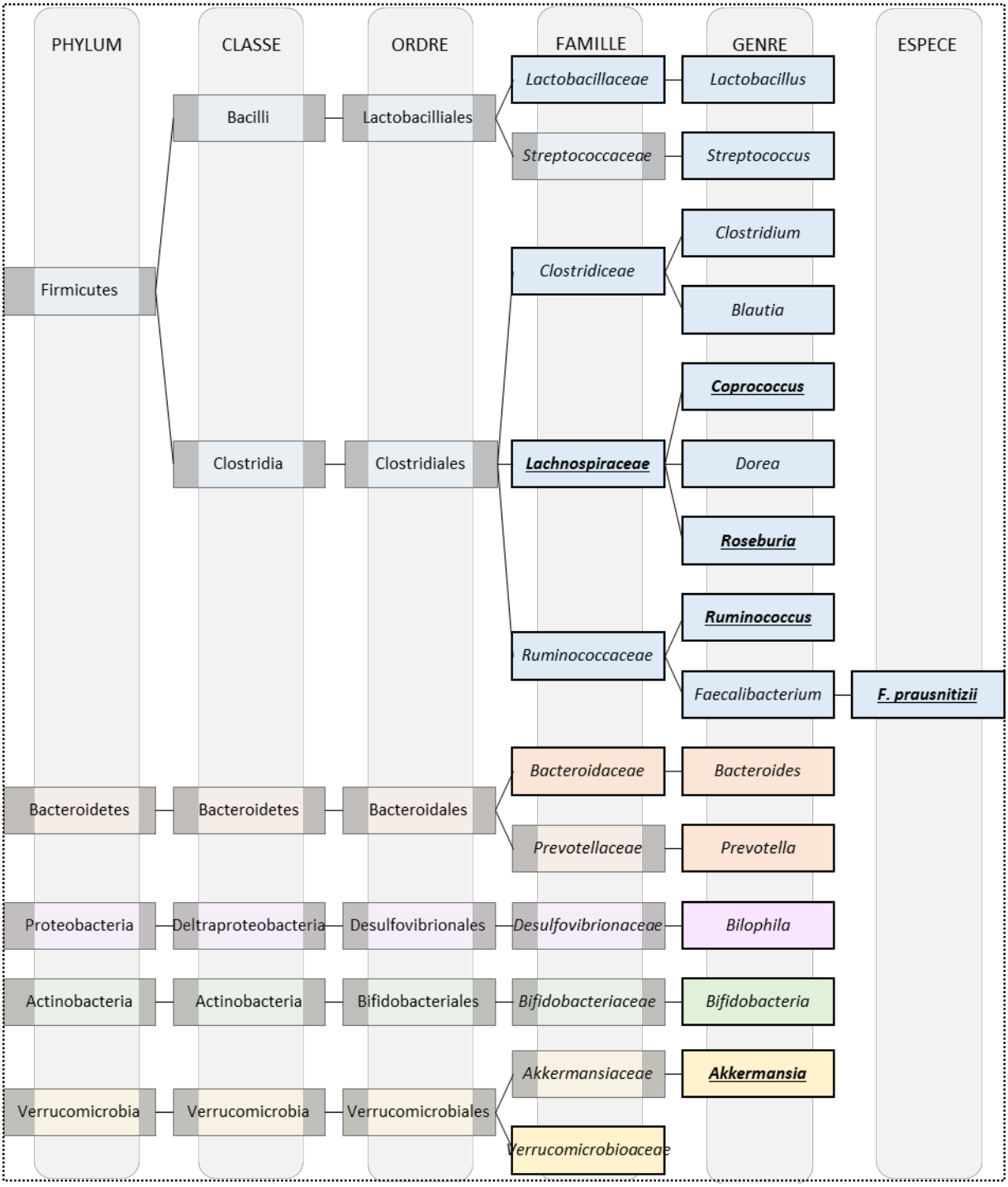


Figure 42 – Classification phylogénétique des bactéries modulées dans plusieurs maladies neurologiques
Représentation schématique de la classification phylogénétique des bactéries modulées dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans une autre pathologie neurologique (maladie de Parkinson, Sclérose en plaques et/ou maladie de Huntington).
(en gras et souligné) : bactéries modulées de manière similaire dans la maladie d'Alzheimer et Parkinson

Il est intéressant de noter qu'il y a des modulations similaires entre la MA et la maladie de Parkinson [Figure 42 – bactéries en gras et soulignées] :

- Une diminution des genres *Coprococcus*, *Roseburia* et *Ruminococcus*, qui possèdent des effets bénéfiques pour la santé par la production d'AGCC, notamment de butyrate (Järbrink-Sehgal & Andreasson, 2020; Reau & G, 2018; Tamanai-Shacoori et al., 2017).
- Une augmentation du genre *Akkermansia*, qui permet de diminuer la perméabilité intestinale en activant les cellules productrices de mucus (Lugt et al., 2019). Son augmentation dans ces pathologies pourrait donc être vue comme protectrice.
- Une diminution de l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, qui est la seule espèce connue à ce jour de la famille des *Faecalibacterium*. Elle est notamment associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin où elle se retrouve diminuée, et possède un rôle anti-inflammatoire via la production de butyrate (Lenoir et al., 2020; Sokol et al., 2008).

L'émergence des hypothèses suggérant que le développement de la MA et MP démarrerait dans l'intestin, une étude plus approfondie de ces populations bactériennes pourrait apporter de nouvelles connaissances sur les formes sporadiques de ces pathologies. En effet, H. Braak suggère que la MP s'initie au niveau du SNE suite à l'entrée de pathogènes via la cavité nasale, pour enfin s'étendre dans le SNC via le nerf vague (Rietdijk et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré une expression aberrante de l'α-synucléine au niveau du tractus gastro-intestinal chez les patients atteints de la MP (F. Yan et al., 2018). De même, une neuropathologie intestinale est observée dans la MA.

Bien que les bactéries soient prépondérantes dans la composition du microbiote intestinal, des études se sont également intéressées aux champignons, représentant environ 0,1% du microbiote intestinal et référencés sous le terme de mycobiote, dans le cadre de la MA. Deux études récentes démontrent qu'il existe également une dysbiose intestinale mycobienne chez des patients atteints de la MA ou ayant des altérations cognitives modérées (Ling, Zhu, Liu, et al., 2020; Nagpal et al., 2020).

ii. Associations avec la sévérité de la pathologie

L'abondance de certaines populations bactériennes est corrélée avec la sévérité de la pathologie, notamment avec le score du MMSE, supportant l'implication du microbiote intestinal dans le développement de la MA.

- Vogt *et al.* montrent que les genres bactériens augmentés chez les patients sont corrélés à une diminution de l'$A\beta_{42}$ et à une augmentation de la quantité de protéines Tau hyperphosphorylées dans le LCS (Vogt et al., 2017).
- Cattaneo *et al.* montrent une corrélation positive entre les taux de cytokines pro-inflammatoires NLRP3, CXCL2 et IL-1β et les genres *Escherichia* et *Shigella*, et une corrélation négative entre ces mêmes cytokines et l'espèce *Eubacterium rectale* (Cattaneo et al., 2017).
- Liu *et al.* montrent une corrélation négative pour la famille des *Enterobacteriaceae*, et positive pour les *Bacteroidetes* et *Ruminococceae* avec le score MMSE (P. Liu et al., 2019).
- Li *et al*. montrent qu'une augmentation des *Blautia* et *Dorea* est associée à un faible score au MMSE, et augmentation des *Faecalibacterium* et *Butyricicoccus* à un haut score. Ils observent également une corrélation négative significative entre l'abondance des *Lactobacillus* et le taux de plaques amyloïdes (B. Li et al., 2019).
- Enfin, Ling *et al*. montrent *qu'Akkermansia* montre la plus forte corrélation négative avec le score MMSE. De même l'augmentation des bactéries productrices de lactate telles les *Bifidobacterium* et la diminution des productrices de butyrate telles que *Coprococcus*, *Butyricicoccus Faecalibacteria*, *Gemmiger* et *Roseburia*, montrent une corrélation positive avec le score MMSE (Ling, Zhu, Yan, et al., 2020).

iii. Etudes cliniques

Une récente étude de cas a rapporté les effets bénéfiques d'une modulation de ce microbiote intestinal dysbiotique dans la MA (Hazan, 2020) : un patient, sous traitement donépézil et mémantine, a reçu une transplantation de microbiote fécal provenant de sa compagne afin de traiter des infections récurrentes à *Clostridium difficile*. Une augmentation graduelle des performances cognitives et du score au MMSE ont été observées à partir de deux mois post-traitement qui se sont maintenues jusqu'à six mois post-traitement.

Un essai clinique multicentrique chinois a montré qu'une supplémentation en GV-971®, un oligomannate de sodium qui a reçu une autorisation de mise sur le marché en Chine en 2019

pour le traitement de la MA, induit une amélioration persistante et continue de la cognition chez des patients atteints de la MA ((Xiao et al., 2021), NCT02293915). Plusieurs essais sont en cours pour valider l'efficacité de ce composé au niveau mondial sur des patients atteints de MCI lié à la MA (NCT04520412) et valider l'innocuité d'un dosage plus élevé du composé (NCT03715114). Une étude clinique, visant à analyser la faisabilité d'une transplantation de microbiote fécal chez des patients, a dû s'arrêter en raison de la détection du SARS-CoV-2 dans les fèces des sujets donneurs (NCT03998423).

c. Le métabolome intestinal

Le métabolome intestinal, comprenant les métabolites bactériens et ceux produits par les enzymes humaines, joue également un rôle dans la maladie d'Alzheimer. En effet, des études d'analyse métabolomique ont mis en évidence la présence d'une dysbiose du métabolome intestinal chez les patients atteints de la MA.

Une analyse récente ciblant spécifiquement les métabolites dérivés du tryptophane, les acides gras à chaînes courtes et les acides biliaires a montré des altérations de plusieurs métabolites : diminution du précurseur de la sérotonine, le 5-hydroxytryptophane, et de la sérotonine et augmentation drastique de l'indole-3-pyruvate ; diminution de l'acétate, du propionate, du butyrate, de l'acide formique, du 2-méthylbutyrate, du valérate et de l'acide lithocholique cytotoxique (L. Wu et al., 2021). Le taux de sérotonine est également diminué au niveau plasmatique (Whiley et al., 2021). D'autres études ont également rapporté des altérations dans le métabolome intestinal mais elles ont eu recours à des analyses métabolomiques non-ciblées ou établi des associations entre les OTU identifiées par analyse métagénomique du gène de l'ARN16S et les voies métabolomiques, ce qui diminue la profondeur d'analyse (Ling, Zhu, Yan, et al., 2020; Xi et al., 2021).

i. Les acides gras à chaînes courtes

Les AGCC (acides gras à chaînes courtes), principaux métabolites bactériens, ont été associés à la MA dans plusieurs études ; le butyrate étant celui qui ressort majoritairement.

Le butyrate est un AGCC d'importance en raison de sa fonction de substrat pour la prolifération et la différenciation des colonocytes. Il module également la réponse inflammatoire en agissant comme inhibiteur des HDAC diminuant ainsi l'activation de la voie NF-κB et la production de cytokines pro-inflammatoires (Place et al., 2005), et augmente

l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-18 *via* l'activation des RCPG FFA2, FFA3 et GPR109a (Priyadarshini et al., 2018).

Les bactéries productrices de butyrate appartiennent principalement au phylum Firmicutes, à la famille *Lachnospiraceae* et les deux espèces principalement responsables de cette production sont *Faecalibacterium prausnitizii* et *Eubacterium rectale,* dont l'abondance est diminuée chez les patients atteints de la MA, et est négativement corrélée à la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et à l'inflammasome NLRP3 au niveau sanguin (Marizzoni et al., 2020). Il a également été montré que le butyrate inhibe la formation d'agrégats de peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ (Ho et al., 2018), et que le butyrate de sodium protège de la toxicité induite par les peptides Aβ en agissant sur le récepteur GPR109a *in vitro* (J. Sun et al., 2020). Par ailleurs, l'administration de butyrate dans la nourriture réduit la pathologie amyloïde et améliore les performances de mémoire du modèle murin 5XFAD C57BL/6SJL (Fernando et al., 2020).

ii. Les triméthylamines

La TMAO, une triméthylamine, provient du métabolisme de la choline en TMA par les bactéries, suivie de la conversion de la TMA par les enzymes hépatiques. La TMAO affecte le métabolisme du cholestérol en diminuant le transport inverse du cholestérol, un mécanisme permettant d'éliminer l'excès de cholestérol des tissus périphérique et de le transporter au foie où il sera ensuite excrété de l'organisme (Chistiakov et al., 2015; Janeiro et al., 2018). L'altération du métabolisme du cholestérol et le développement de maladies cardiovasculaires, associés à un taux élevé de TMAO, sont des facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, des analyses ont démontré que la TMAO augmente au niveau plasmatique avec le vieillissement et que les patients atteints de la MA présentent des taux plus élevés dans le LCS (Li et al., 2018; Vogt et al., 2018). L'administration de TMAO dans des souris souche induit des déficits de plasticité synaptique et des altérations cognitives (Govindarajulu et al., 2020; Li et al., 2018). Une analyse récente de randomisation mendélienne bidirectionnelle combinant des méta-analyses génétiques et des méta-analyses du métabolome humain ne montre aucune corrélation entre la TMAO, ses précurseurs et la MA (Z. Zhuang et al., 2021).

Étant donné que des inhibiteurs de TMAO diminuent la pathologie amyloïde et la neuroinflammation dans le modèle murin APP/PS1 (Gao et al., 2019), et que l'administration de méthanogènes (microorganismes produisant du méthane) convertissent la TMA en

méthane et diminuent ainsi la production de TMAO (Gaci et al., 2014), des thérapies ciblant ces métabolites peuvent également présenter un intérêt thérapeutique.

iii. Les dérivés du tryptophane

Les dérivés du tryptophane de la voie de l'indole, en particulier l'indole-3-sulfate, l'indole-3-aldéhyde et l'acide indole-3-propionique, sont des activateurs du facteur de transcription AhR (Hubbard et al., 2015) et sont en capacité de passer la BHE. L'activation d'AhR va inhiber l'activation et la translocation nucléaire de NF-κB au niveau astrocytaire et ainsi l'inflammation (Rothhammer et al., 2016). De même, il a récemment été montré que l'acide 5-hydroxyindole acétique et l'acide kynurénique, en interagissant avec l'AhR vont augmenter l'expression et l'activité de la Néprilysine, une métalloprotéinase ayant un rôle clé dans la dégradation et la clairance des peptides Aβ dans le cerveau (Maitre et al., 2020). Il a également été montré qu'une alimentation riche en tryptophane diminue le taux de peptides amyloïdes dans le modèle murin 3xTg et augmente le taux de transporteurs de la sérotonine, suggérant une augmentation de la neurotransmission sérotoninergique (Noristani et al., 2012). Une augmentation du tryptophane alimentaire en clinique humaine montre également une efficacité à diminuer l'irritabilité et la dépression des patients atteints de la MA (Radulović & Minahan, 2004).

iv. Les acides biliaires

Le cholestérol est métabolisé par les hépatocytes en acides biliaires tels que l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, qui sont ensuite transformés en acides biliaires secondaires tels que l'acide lithocholique, l'acide désoxycholique et l'acide ursodéoxycholique par les bactéries intestinales. Ils sont en capacité de passer la BHE et entrer dans les cellules neuronales via des transporteurs.

Une étude récente montre une association entre un faible taux sanguin d'acide cholique et d'acide chénodésoxycholique et la présence de dépôts amyloïde et d'une atrophie cérébrale en clinique humaine (Varma et al., 2021). Une seconde étude analysant spécifiquement 20 acides biliaires au niveau plasmatique chez des patients atteints de la MA a montré une augmentation significative de l'acide lithocholique, l'acide glycochénodésoxycholique, de l'acide glycodéoxycholique et de l'actide glycolithocholique (Marksteiner et al., 2017). Cette même étude a permis de mettre en évidence l'augmentation du taux d'acide lithocholique

une dizaine d'année avant le diagnostic de la MA, suggérant qu'il pourrait être considéré comme biomarqueur plasmatique de la pathologie.

L'acide ursodésoxycholique présente des effets bénéfiques pour la MA. En effet, il est en capacité d'inhiber le facteur NF-κB dans des cellules microgliales, et améliore les fonctions mitochondriales de fibroblastes provenant de patients atteints des formes sporadiques ou familiales de la maladie d'Alzheimer (Bell et al., 2018; Joo et al., 2004). D'autres études concernant des traitements qui agissent sur les récepteurs des acides biliaires membranaires Gpbar1 (ou TGR5) et nucléaires FXR ont permis de mettre en avant l'effet opposé de ces récepteurs dans la pathologie de la MA : un agoniste du récepteur Gpbar1 atténue significativement les déficits cognitifs et la neuroinflammation dans un modèle murin d'injection d'$A\beta_{42}$ tandis d'un agoniste des récepteurs FXR aggrave l'apoptose de cellules neuronales traitées avec des peptides $A\beta_{42}$ (Q. Chen et al., 2019; X. Wu et al., 2018).

v. Les vitamines

Les vitamines, de manière générale, présentent des effets bénéfiques pour la MA (Mielech et al., 2020) :

- les vitamines B augmentent la méthylation de l'ADN qui est diminué chez les patients atteints de la MA, et améliorent leurs performances cognitives
- les vitamines A et leurs dérivés augmentent l'expression de neurotransmetteurs au niveau cérébral *via* l'interaction avec les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque, et sont en capacité d'augmenter l'expression de l'ADAM10 stimulant ainsi la voie non-amyloïdogène
- les vitamines C et E ont des effets antioxydants en diminuant le taux d'espèces réactives de l'oxygène, en diminuant les dépôts amyloïdes et en chélatant les ions métalliques tels que le fer, le cuivre et le zinc.

L'ensemble non-exhaustif de ces études liant le métabolome intestinal et la maladie d'Alzheimer met en avant l'intérêt du développement de stratégies périphériques prenant en compte les métabolites intestinaux qui sont pour la plupart en capacité de passer la BHE et d'agir directement sur la pathologie au niveau cérébral.

d. La neuropathologie périphérique

i. Chez le rongeur

Dans les modèles précliniques amyloïdes, différentes études montrent la présence d'une neuropathologie intestinale.

- Dans le modèle murin APP/PS1 C57BL/6 des études ont rapporté une augmentation du taux d'APP et de l'enzyme BACE1 au niveau intestinal, une élévation des niveaux de peptides Aβ au niveau neuronal et dans les fèces, et une perte des neurones cholinergiques (Han et al., 2017; Puig et al., 2015). Une altération de la composition du microbiote précédant la détection des plaques amyloïdes est également observée (Chen et al., 2020).
- Dans le modèle murin TgCRND8 C57BL/6, l'APP est exprimé au niveau intestinal, plus fortement qu'au niveau cérébral, avec présence de peptides Aβ et une augmentation des niveaux de transcription de la GFAP, TLR4 et Nestin (Semar et al., 2013).
- Dans le modèle murin 5XFAD C57BL/6J, une diminution de l'activité de l'AChE est associée à une diminution du transit intestinal, une augmentation de l'expression de la GFAP et une légère modulation de l'expression des gènes BACE1 et MAPT (Stoye et al., 2020).
- Dans la génération F1 du modèle murin Tg2576 C57BL/6J croisé avec des souris BALB/C, une altération de la barrière et de l'absorption intestinale, une présence de dépôts amyloïdes vasculaire au niveau de l'épithélium intestinal et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires au niveau plasmatique ont été rapportés préalablement à la détection des agrégats amyloïdes cérébraux (Honarpisheh et al., 2020).

Enfin, une étude récente montre que l'injection d'oligomères d'$A\beta_{42}$ au niveau de l'épithélium intestinal de souris induit, de manière dépendante du nerf vague, le développement de dépôts amyloïdes au niveau cérébral ainsi qu'une altération de la cognition. En effet, quelques heures après l'injection, ces oligomères sont internalisés par les neurones cholinergiques périphériques, puis à un an post-traitement, ils sont détectés au niveau du nerf vague et dans le cerveau et sont associés à des troubles mnésiques (Y. Sun et al., 2020) [Figure 43]. De même, l'administration orale d'oligomères d'$A\beta_{42}$ est en capacité de moduler le composition du microbiote intestinal de souris saines (Guilherme et al., 2020).

Pour la pathologie Tau, une récente étude n'observe pas de modifications de la phosphorylation ni de la localisation de Tau au niveau du SNE dans le modèle murin hTau C57Bl/6 J en comparaison à des souris saines (Lionnet et al., 2018).

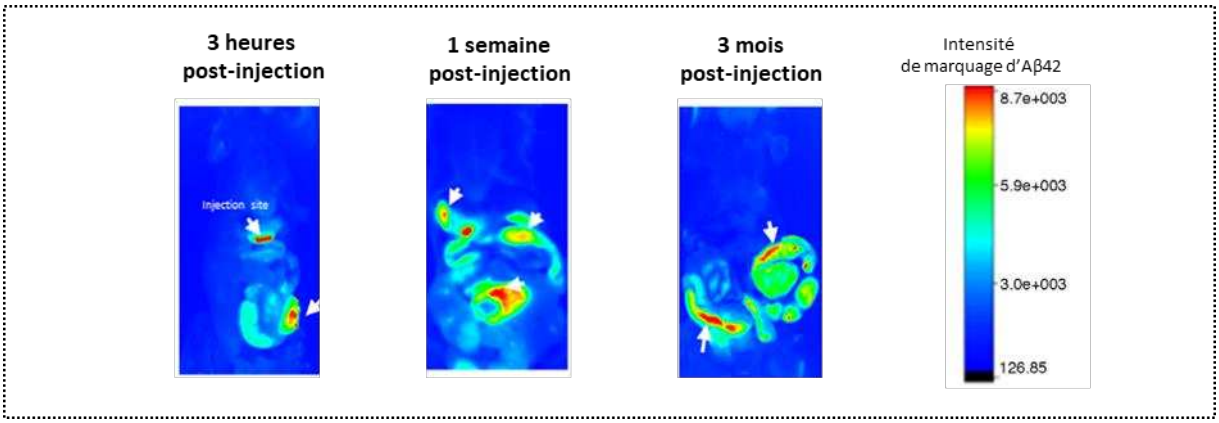


Figure 43 – Distribution de peptide amyloïde Aβ$_{42}$ dans l'estomac et l'intestin de souris
Diffusion des peptides Aβ$_{42}$ dans l'estomac puis dans l'ensemble de l'intestin de souris après injection d'Aβ$_{42}$ marqué au Fluor HiLyte Fluor 555 (flèches blanches : sites d'injections). Analyses in vivo de la distribution de l'Aβ$_{42}$ marqué. 3 heures post-injection, le marquage est présent au niveau de l'estomac et du colon proximal, à 1 semaine le marquage est présent au niveau du segment intestinal jejunum, puis s'étend ensuite à l'ensemble de l'estomac et du jéjunum à 1 mois post-injection. D'après Sun et al. 2020.

ii. En clinique humaine

L'analyse post-mortem des intestins de patients atteints de la MA ont permis de montrer qu'il existe également une neuropathologie au niveau périphérique. En effet, des études décrivent la présence de dépôts amyloïdes au niveau intestinal (Joachim et al., 1989), plus précisément au niveau neuronal (Puig et al., 2015), et la présence d'APP dans les neurones et le cellules gliales satellites des ganglions dorsaux rachidiens et entériques (Arai et al., 1991). Une analyse plus récente montre la présence de dépôts Aβ intestinaux chez des patients atteints de la MA en comparaison de sujets contrôles (Honarpisheh et al., 2020) [Figure 44].

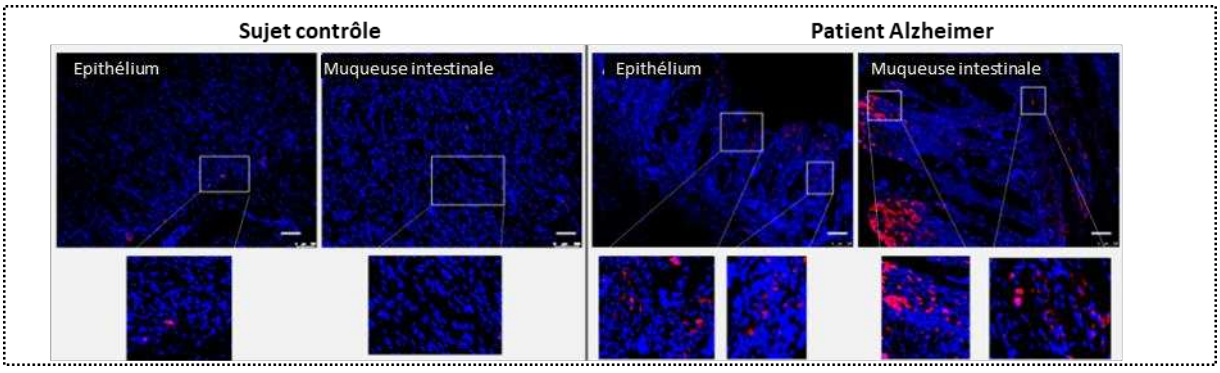


Figure 44 – Présence de dépôts amyloïdes intestinaux chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer
Détection d'agrégats amyloïdes chez un patient atteint d'une forme sporadique de la maladie d'Alzheimer en comparaison à un sujet contrôle. Analyse microscopique de tissus d'épithélium et de muqueuse intestinale : Aβ (rouge) et ADN (bleu). Barre d'échelle : 100µm. D'après Honarpisheh et al. 2020.

En ce qui concerne la protéine Tau, en 1993, une analyse du Dr. Shankle *et al.* du plexus myentérique d'Auerbach utilisant un anticorps qui reconnait une conformation mal-repliée de la protéine Tau n'a montré aucun marquage, suggérant qu'il n'y a pas de pathologie Tau au niveau du SNE. Une analyse plus récente montre la présence de structures ressemblant aux enchevêtrements neurofibrillaires (Puig et al., 2015), mais des études affirment qu'il y a une faible probabilité d'avoir une pathologie Tau au niveau du SNE au vu du peu de patients présentant des formes phosphorylées de Tau au niveau du colon (Dugger et al., 2019).
Des essais cliniques visant à analyser d'avantage le SNE de patients sont en cours (NCT03472183, NCT02841605).

e. D'autres acteurs périphériques

Le microbiote bactérien est vraisemblablement responsable, en partie, de la physiopathologie et de la progression de la MA lors qu'il n'est pas en état d'eubiose. Des études plus approfondies concernant ce microbiote et les facteurs qu'il produit ont apporté des précisions, outre les populations bactériennes et les métabolites, sur les acteurs microbiens impliqués dans la MA.

i. Les protéines Curli

Des chercheurs se sont intéressés aux protéines Curli qui sont produites par les bactéries intestinales et forment des fibrilles amyloïdes au niveau de leur paroi cellulaire (A. L. Miller et al., 2021). Elles sont les constituant majeurs de la matrice extracellulaire des biofilms bactériens et permettent l'adhésion entre bactéries. Au niveau structural, elles sont similaires aux peptides Aβ et α-synucléines retrouvées respectivement dans la MA et la MP. Deux hypothèses proposent un mécanisme par lequel ces biofilms contenant des fibrilles amyloïdes peuvent influencer ces pathologies : en engendrant une neuroinflammation *via* une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et de l'altération de la barrière intestinale étant donné qu'elles peuvent activer les récepteurs TLR et l'inflammasome NLRP3 ; ou en engendrant un mécanisme de « seeding » avec les protéines amyloïdes humaines. En effet, des rats Fisher 344 âgés, connus pour développer des dépôts d'α-synucléine dans le plexus sous-muqueux (R. J. Phillips et al., 2009) et qui ont reçu des bactéries possédant des protéines curli, présentent une augmentation de dépôts neuronaux d'α-synucléine dans l'intestin et le cerveau (S. G. Chen et al., 2016) [Figure 45].

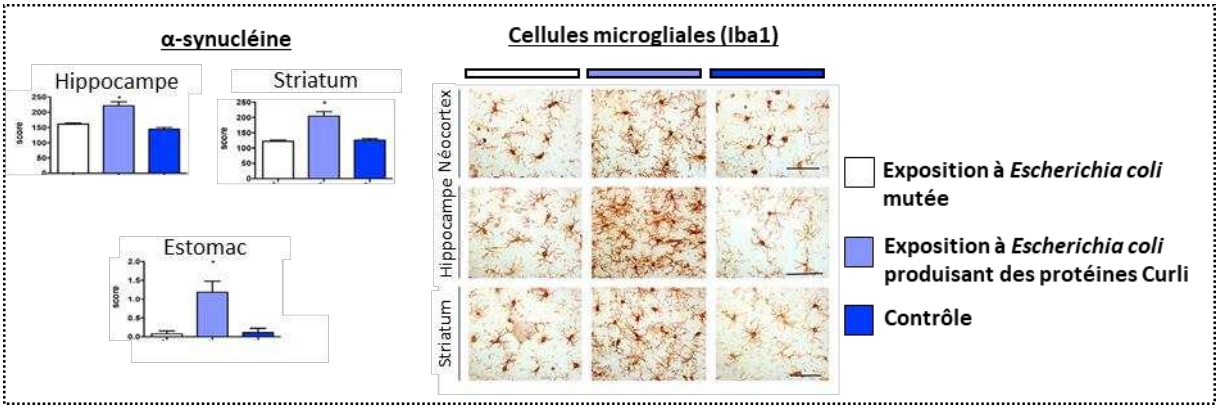


Figure 45 – Dépôts d'α-synucléine et de inflammation après exposition à des protéines Curli

L'administration hebdomadaire et durant 2 mois, de bactéries d'Escherchia coli (10^9 cfu) produisant des protéines Curli, augmente les dépôts d'α-synucléine au niveau intestinal et augmente l'inflammation cérébrale de rats Fisher 344 âgés. Quantification du taux d'α-synucléine dans l'hippocampe, le striatum et l'estomac, et image en microscopie de cellules microgliales (marquage Iba1) dans le néocortex, l'hippocampe et le striatum. Barre d'échelle : 20µm. D'après Chen et al. 2016.

ii. Les constituants membranaires des bactéries gram-négatives

Les endotoxines (ou LPS), constituants majoritaires de la membrane externe des bactéries gram négatives, semblent jouer un rôle dans le développement de la MA (Brown, 2019). De forte concentrations de LPS sont retrouvées au niveau sanguin et cérébral chez les patients et également au niveau des plaques amyloïdes (Zhan et al., 2016; Zhao et al., 2017). De plus, le LPS est en capacité d'engendrer la production et l'agrégation d'Aβ *in vivo* suite à des injections intrapéritonéales chez la souris (Lee et al., 2008). Le passage du LPS au travers de la BHE n'est pas totalement élucidé et semblerait se faire *via* un mécanisme de transport médié par les lipoprotéines (Vargas-Caraveo et al., 2017). De plus, de fortes doses de LPS induisent une altération de la perméabilité de la BHE (Banks et al., 2015).

Le PSA a un effet anti-inflammatoire via le récepteur TLR2 en activant le développement des lymphocytes Treg Foxp3+ et stoppant celui des Th17 (Round et al., 2011). Il provient essentiellement de l'espèce *Bacteroidetes fragilis* qui se trouve principalement diminuée dans la MA.

iii. Un microbiote cérébral ?

Comme mentionné précédemment, il est possible qu'il y ait également un microbiote au niveau cérébral. Ces micro-organismes, tels que le VIH, les herpès virus (HSV), *Chlamydophila pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* (responsable de la maladie de Lyme), *Propionibacterium acnes* et *Porphyromonas gingivalis ou leur ADN* pourraient pénétrer dans le cerveau *via* une

voie olfactive neuronale et/ou *via* l'altération de la BHE (Balin et al., 1998; Carter, 2017; Kornhuber, 1996; Lin, MA, et al., 2002; Miklossy et al., 2004; Poole et al., 2013).

Bactéries

Des chercheurs ont récemment analysé l'effet de l'ADN bactérien sur la protéine Tau. Ils ont démontré que l'ADN provenant des bactéries *Porphyromonas gingivalis* and *Borrelia burgdorferi*, qui ont été retrouvées au niveau cérébral, est en capacité d'induire un mauvais repliement et une agrégation de la protéine Tau, et que cet effet est prévenu en présence d'ADNase (Tetz et al., 2020). De même, *Chlamydophila pneumoniae* a été détectée dans le cerveau de patients atteints de la MA (Balin et al., 1998). Des analyses immunohistochimiques sur des cerveaux *post-mortem* ont permis de démontrer que cette espèce bactérienne infecte aussi bien les cellules neuronales que microgliales et astrocytaires, et que les cellules infectées se trouvent à proximité des dépôts amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires (Gérard et al., 2006).

Virus

Les personnes atteintes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), qui est en capacité de pénétrer dans le cerveau deux semaines après la primo-infection, présentent des similitudes avec les patients atteints de la MA : augmentation du taux d'$A\beta_{42}$, de la protéine Tau totale et de la protéine Tau hyperphosphorylée dans le LCS, présence de dépôts amyloïdes cérébraux, présence d'une dégénérescence corticale et d'altérations des performances mnésiques (Canet, Dias, et al., 2018; Sturdevant et al., 2015). Les herpèsvirus, qui sont des virus neurotropes, semblent également pouvoir jouer un rôle dans la MA. Leur réplication au niveau cérébral peut entraîner des encéphalites (Gnann & Whitley, 2017). De plus les herpèsvirus, et notamment l'HSV-1 ont été fréquemment retrouvé dans le cerveau de personnes atteintes de la MA (Lin, Wozniak, et al., 2002; Steel & Eslick, 2015). Une étude épidémiologique récente montre une association entre l'infection à herpèsvirus et les marqueurs d'imagerie cérébrales dans la MA, ajoutant un argument supplémentaire à l'hypothèse d'une origine infectieuse de la MA (Linard et al., 2021).

Champignons

Enfin, des études ont également démontré la présence de champignons tels que *Candida glabrata* dans le cerveaux de patients atteints de la MA (Alonso et al., 2014; Pisa et al., 2015).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La maladie d'Alzheimer (MA) reste à ce jour sans traitement curatif et fait l'objet d'une recherche active visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le microbiote intestinal étant perçu comme un nouvel acteur clé des pathologies neurologiques (Cryan et al., 2019; Hsiao et al., 2013; Sampson et al., 2016), nos travaux visent à comprendre son rôle dans l'apparition et le développement de la MA. Au démarrage de notre étude, les données de la littérature montraient une corrélation entre la composition du microbiote intestinal et l'intensité de la pathologie amyloïde chez des personnes âgées et chez les souris APP/PS1 (Cattaneo et al., 2017; Harach et al., 2017). Parallèlement, dans un autre modèle murin d'amyloïdose, le modèle 5XFAD, dont la physiopathologie est décrite en partie 1 des résultats (Ismeurt et al., 2020), les données préliminaires de notre équipe démontraient une dysbiose du microbiote intestinal. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont été axés sur la modulation du microbiote intestinal dans le modèle 5XFAD, afin d'évaluer l'impact de la composition bactérienne sur la progression de la pathologie et de proposer des pistes thérapeutiques innovantes. Dans le cadre du développement de nouveaux traitements et en collaboration avec le Pr. P. Dallemagne (Université de Caen), l'équipe a conçu des ligands multi-cibles à double action montrant des effets prometteurs (Lecoutey et al., 2014; Rochais et al., 2015) mais également une nouvelle série de composés à triple action. En conséquence, les objectifs de cette étude se sont focalisés sur :

1/ Caractérisation *in vivo* d'un ligand multi-cible et analyse de son effet sur le microbiote intestinal

Le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'efficacité *in vivo* d'un nouveau composé multi-cible développé au sein de l'équipe, la donécopirdine, qui est à la fois inhibitrice de l'acétylcholinestérase, agoniste du récepteur 5-HT_4 et antagoniste du récepteur 5-HT_6. Pour cela, des paradigmes de traitements ont été mis en place dans le modèle murin 5XFAD pour évaluer les propriétés du composé à prévenir/ralentir la pathologie ou à traiter/contrecarrer des déficits installés. Suite à ces traitements préventifs ou curatifs, les performances mnésiques ainsi que la pathologie amyloïde et la gliose cérébrale ont été analysées. Dans le paradigme préventif, une analyse de la composition du microbiote intestinal a été effectuée

afin d'évaluer l'effet du composé pharmacologique multi-cible sur la dysbiose intestinale présente dans ce modèle murin.

2/ Modulation du microbiote intestinal par des modulateurs microbiens classiques

Dans un second temps, nous avons évalué l'impact d'une modulation du microbiote intestinal dans le modèle murin 5XFAD sur la pathologie amyloïde *via* l'utilisation d'un cocktail d'antibiotiques ou l'administration d'un prébiotique, et cela en présence ou non d'une altération du métabolisme induite par un régime alimentaire riche en graisse.

3/ Modulation du microbiote intestinal par transplantation fécale

Enfin, par des techniques de transplantation de microbiote fécal, avec pré déplétion du microbiote endogène ou non, nous avons implanté le microbiote intestinal dysbiotique de souris 5XFAD de 2 mois et 6 mois d'âge à des souris saines afin d'évaluer la causalité de ce microbiote dans les troubles cognitifs. En miroir, nous avons implanté le microbiote intestinal de souris saines de 2 mois d'âge à des souris 5XFAD afin d'évaluer la possibilité de ralentir la physiopathologie de ce modèle en implantant un microbiote sain.

RESULTATS

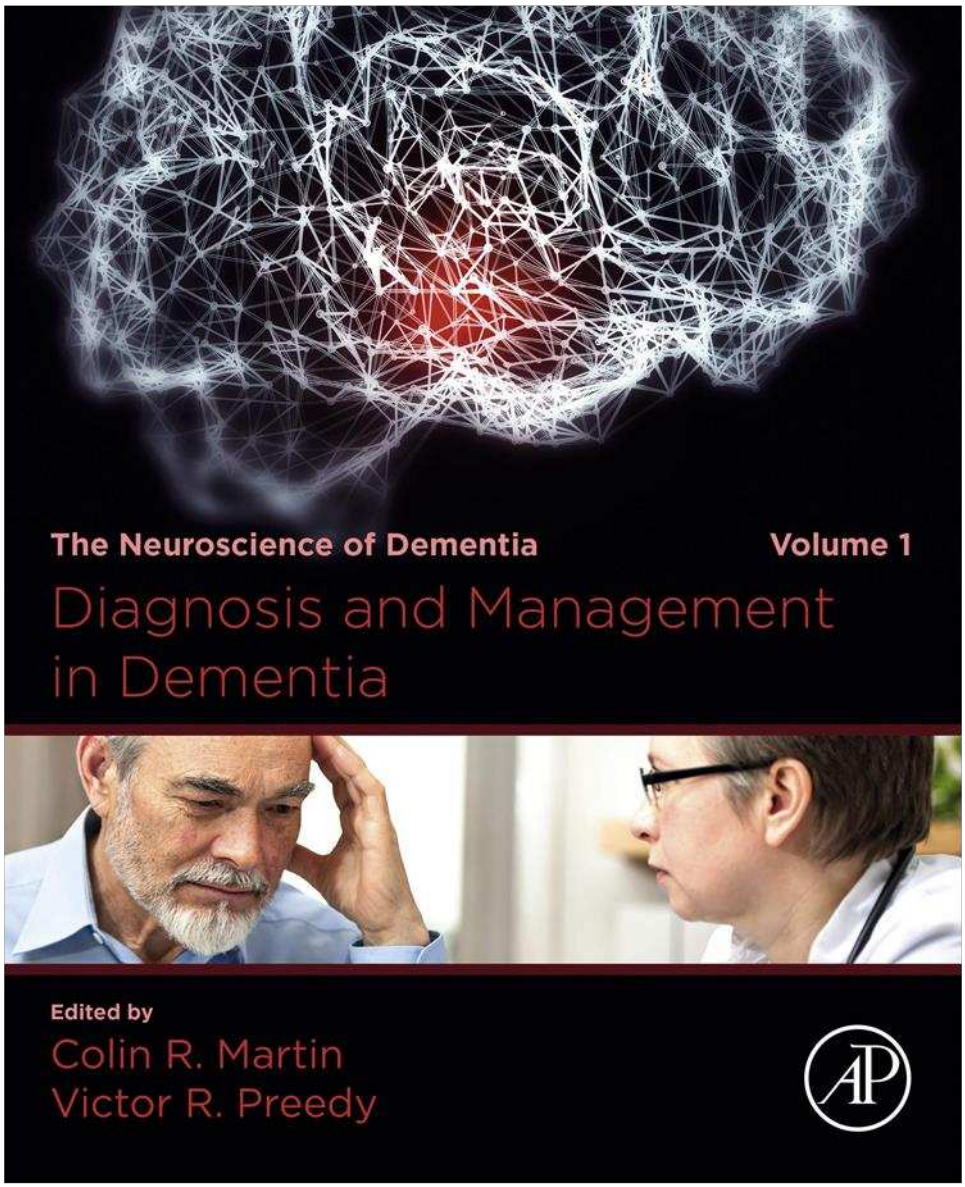
PARTIE 1

LE MODELE MURIN D'AMYLOIDOSE 5XFAD

The 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease

Caroline Ismeurt, Patrizia Giannoni, Sylvie Claeysen

Colin R. Martin, Victor R. Preedy. Diagnosis and Management in Dementia, Academic Press, 2020, Pages 207-221, ISBN 9780128158548, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815854-8.00013-6.



CHAPTER 13

The 5×FAD mouse model of Alzheimer's disease

Caroline Ismeurt[1], **Patrizia Giannoni**[2], **Sylvie Claeysen**[1]
[1]IGF, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France; [2]EA7352 CHROME, University of Nîmes, Nîmes, France

List of abbreviations

AD Alzheimer's disease
APP amyloid precursor protein
Aβ amyloid-β peptide
BACE1 β-secretase
BDNF brain-derived neurotrophic factor
CAA cerebral amyloid angiopathy
FAD familial Alzheimer's disease
GFAP glial fibrillary acidic protein
Iba1 ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL interleukin
LTP long-term potentiation
NFT neurofibrillary tangle
PHFs paired helical filaments
PSEN1 presenilin 1
TGFβ transforming growth factor β
TLR Toll-like receptor
TNFα tumor necrosis factor α

Mini-dictionary of terms

Amyloid plaques extracellular aggregates mainly composed of neurotoxic amyloid peptides and found in postmortem brains of AD patients. With aging, plaques can also appear in the brains of cognitively healthy people.

Neurofibrillary tangles intracellular fibrillary structures composed of hyperphosphorylated tau protein. These aggregates are a marker of AD but are also found in tauopathies.

Complement system part of the immune system and corresponds to plasma proteins that recognize pathogens and participate in their elimination.

Novel object recognition test memory test including a training phase in which the mouse can explore two similar objects and a restitution phase in which one of the objects is replaced by a novel object. The amount of time between the training and the restitution phase allows analysis of the short-term memory (e.g., 1 h) or the long-term memory (e.g., 24 h).

Pericytes perivascular cells involved in the regulation of capillary blood flow and maintenance of the BBB.

Diagnosis and Management in Dementia
ISBN 978-0-12-815854-8, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815854-8.00013-6
© 2020 Elsevier Inc.
All rights reserved.

Introduction

Many transgenic mouse models have been developed to reproduce the numerous brain features of Alzheimer's disease (AD), ranging from amyloid-β (Aβ) peptide deposition to neurofibrillary tangles (NFTs), neuroinflammation and synaptic alterations, and neuronal loss (Selkoe and Schenk, 2003). As wild-type mice develop neither plaques nor tangles in their life span, the introduction of human genes bearing mutations involved in familial forms of the disease was a key step in recapitulating AD pathology (Oakley et al., 2006). The heterologous mouse line Tg6799, also named 5×FAD, expresses five familial AD mutations under the control of the neuron-specific *thy1* promoter: three mutations on the human amyloid protein precursor (APP695; London, Swedish, and Florida) and two mutations on human presenilin-1 (PS1; M146L and L286V) (Fig. 13.1). No human tau transgene is expressed in this mouse line. The 5×FAD mouse line is the transgenic mouse model of AD presenting the earliest onset and most intense amyloid pathology. Interestingly, this mouse model recapitulates all the neuropathological features associated with AD: amyloid plaques, gliosis, cognitive impairment, neurotransmission defects, synaptic loss, and neurodegeneration (Fig. 13.2). The only missing features are the tau tangles, even if some reports are contradictory on this point. The AD-like pathology in 5×FAD mice can be divided into three phases as in human AD. The asymptomatic phase, around 2 months of age, is characterized by the presence of amyloid plaques and appearance of gliosis (Fig. 13.2). The prodromal phase, with extensive amyloid deposits and gliosis, is defined by the appearance of cognitive deficits around 4 months of age. The symptomatic phase starts around 6 months of age and over, with extreme amyloid pathology and associated neuroinflammation, marked cognitive deficits, and neurotransmission impairments. Finally, late AD-like stages, or "severe AD-like pathology," are characterized by synaptic and neuronal loss around 9 months of age. This chapter describes all the neuropathological and behavioral features of the 5×FAD mouse model to highlight its interest for fundamental research and preclinical studies.

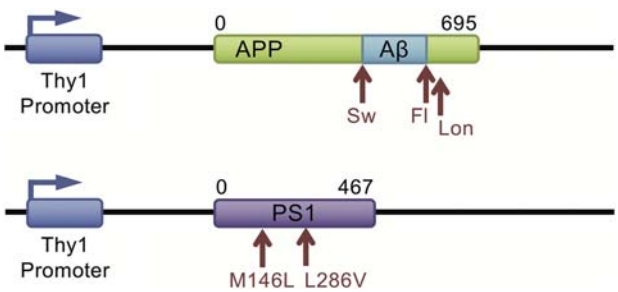


Figure 13.1 Schematic representation of the 5×FAD transgenes. *Arrows* indicate the familial Alzheimer's disease mutations in human amyloid precursor protein (*APP*) and presenilin-1 (*PS1*) transgenes that are under the control of the neuron-specific *thy1* promotor. Coding regions are depicted. For a more complete view of the untranslated regions see Oakley et al. (2006). *Aβ*, amyloid-β peptide.

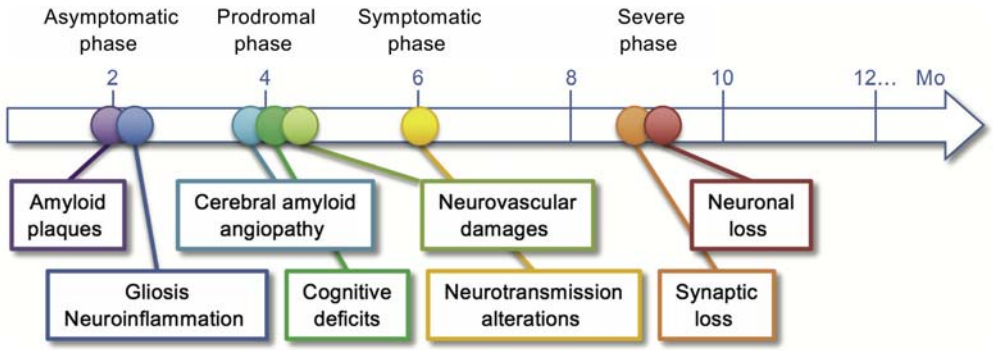


Figure 13.2 Schematic representation of pathology time course in the 5×FAD mouse model. Key Alzheimer's disease features that are reproduced by the mouse *line* are summarized in accordance with the time scale. The putative correspondence with clinical disease is indicated. As it is controversial in the model, tau pathology is not indicated in this picture.

Amyloid pathology

The overproduction and aggregation of Aβ in the brain are major pathological hallmarks of AD. Aβ is produced and released in the extracellular domain through the amyloidogenic pathway of APP processing. This pathway involves two successive cleavages by proteases: BACE1 and γ-secretase. The cleavage by γ-secretase is not precise and leads to several Aβ peptides with different lengths, including $A\beta_{1-40}$ (40 amino acids) and $A\beta_{1-42}$ (42 amino acids), the two main Aβ isoforms. In the 5×FAD mouse model, the three FAD mutations on the human APP transgene are located around the cleavage sites of β- and γ-proteases and are involved in the overproduction of either total Aβ or specifically $A\beta_{1-42}$ peptides. The London (V717I) and Florida (I716V) mutations, located around the γ-secretase cleavage site, have been reported to induce an increase in the $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ratio (De Jonghe et al., 2001; Herl et al., 2009). The Swedish mutation (K670N/M671L), close to the BACE1 cleavage site, has been reported to induce an increase in total Aβ (Hsiao et al., 1996). The two FAD mutations present on the PSEN1 transgene (catalytic subunit of γ-secretase) have been shown to also increase the $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ratio (Citron et al., 1997; Scheuner et al., 1996). Due to a constitutive expression of the transgene, an overproduction of Aβ is detectable as early as 1.5 months of age in 5×FAD mouse brains. This amyloid accumulation corresponds mainly to soluble Aβ peptides ($A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$). At the age of 2 months, Aβ oligomers aggregate in Aβ fibrils and diffuse amyloid plaques, while forming dense amyloid plaques later on. The amyloid pathology begins in the deep cortical layers of the brain and subiculum. Then, with aging of the mice, plaques spread to cover much of the cortex and hippocampus (Schaeffer et al., 2011) (Fig. 13.3). This increase in plaque number and density reaches a plateau at 10 months of age in male 5×FAD mice, whereas in females the maximal density is not even reached at 14 months of age (Bhattacharya, Haertel,

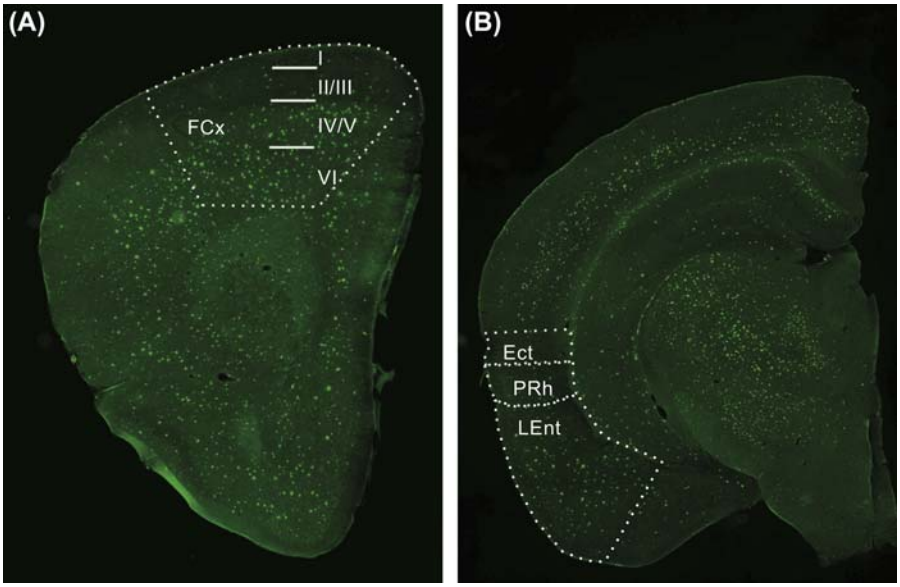


Figure 13.3 Amyloid plaques in the 5×FAD mouse model. Representative images of 30-μm sagittal brain sections in which plaques are stained with thioflavin-S in (A) the frontal cortex and (B) the entorhinal cortex. *I–VI*, cortical layers I to VI; *Ect*, ectorhinal area; *FCx*, frontal cortex; *LEnt*, entorhinal area, lateral part; *PRh*, perirhinal area.

Maelicke, & Montag, 2014). This amyloid load has deleterious effects on the brain, including the development of a persistent neuroinflammation, neuronal loss, cognitive deficits, and inhibition of long-term potentiation (LTP).

Neuroinflammation

Resident microglia and astrocytes, which are innate immune cells of the brain, are clustered around amyloid plaques (Perlmutter, Barron, & Chui, 1990) and are mediators of the neuroinflammation commonly observed in AD (Fig. 13.4). In a healthy brain, the microglia are in a resting state and survey the surrounding area. In the 5×FAD mouse brain, the Aβ pathology induces the activation of microglia into an antiinflammatory state, called M2. This activation is mediated mainly by Toll-like receptor 2, which recognizes $A\beta_{1-42}$ (Liu et al., 2012). M2 microglia release antiinflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor β (Orihuela, McPherson, & Harry, 2016) and have a phagocytic activity that contributes to the clearance of Aβ oligomers. Nevertheless, as the amyloid pathology is persistent, microglial cells fail to clear all Aβ peptides and transit chronically into a proinflammatory state, called M1. Several cytokines, such as IL-6, IL-β, and tumor necrosis factor α, are released, inducing a persistent neuroinflammation, which aggravates brain damage (Spangenberg et al., 2016). This proinflammatory environment is believed to appear around the age of 2 months, when the amyloid deposits have arisen. However, the microglial activation may occur

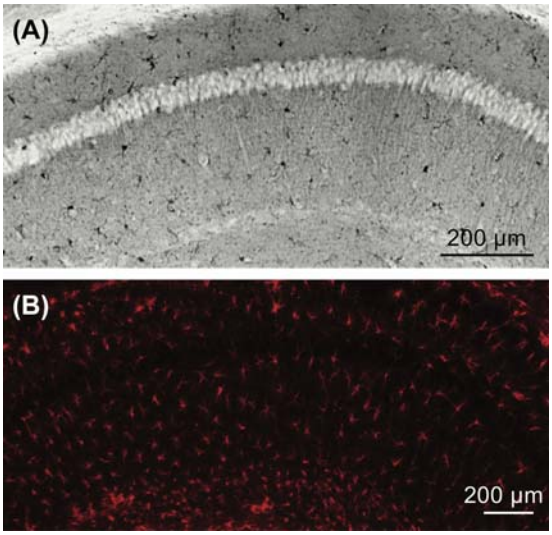


Figure 13.4 Microgliosis and astrogliosis in the 5×FAD mouse model. Representative images of 30-μm sagittal brain sections in the CA1 region of the hippocampus. (A) Ionized calcium-binding adapter molecule 1 staining of microglia. (B) Glial fibrillary acidic protein staining of astrocytes.

earlier (Boza-Serrano, Yang, Paulus, & Deierborg, 2018). The astrocytes, the second type of immune cells in the brain, are activated in a manner proportional to the level of $A\beta_{1-42}$ and amyloid plaques (Oakley et al., 2006). This activation is mediated by C1q, one component of the complement system, and induces the transition of astrocytes into reactive astrocytes (Fonseca, Zhou, Botto, & Tenner, 2004). The latter have a phagocytic activity to clear Aβ peptides and produce neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (Kimura, Takahashi, Tashiro, & Terao, 2006; Wyss-Coray et al., 2003). However, reactive astrocytes also produce proinflammatory cytokines (Johnstone, Gearing, & Miller, 1999), and with aging they present impairments in clearing Aβ peptides and in neuronal support (Iram et al., 2016). This alteration in astrocyte function participates in the maintenance of the chronic neuroinflammation and brain damage.

Behavioral aspects of the model

The 5×FAD mouse model develops different types of memory deficits around the age of 4 months, when amyloid plaques and neuroinflammation are present (Oakley et al., 2006). In many tests involving hippocampus-dependent memory function, such as the Morris water maze, the Y maze, fear conditioning, and object or social recognition, 5×FAD mice have demonstrated impaired performance (Hongpaisan, Sun, & Alkon, 2011; Jawhar et al., 2011). Working memory (short or long term) is altered in 5×FAD mice as early as 4 months of age (in the B6/SJL background) (Giannoni et al., 2013) (Fig. 13.5). An impairment of frontal cortex function has also been demonstrated at 4 months of age using the olfactory H maze and the delayed reaction paradigm

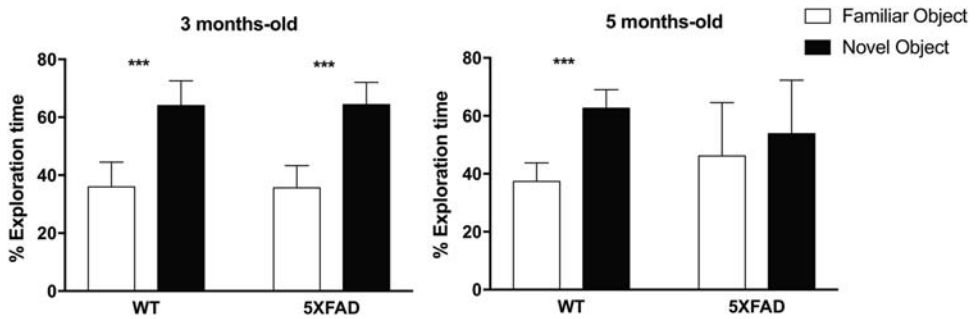


Figure 13.5 Learning performance of 3- and 5-month-old wild-type (*WT*) and 5×FAD mice assessed with the novel object recognition test. The 5×FAD mice are deficient at 5 months of age as indicated by the lower percentage of time devoted to the exploration of the novel object in comparison with the WT mice. Retention interval 24 h, 5–8 mice per group. Data are the means ± SEM. ***$P < .001$.

(Girard et al., 2013). Associative learning memory is also affected in this mouse model, but only around the age of 6 months (Baranger et al., 2017; Roddick, Schellinck, & Brown, 2014). Cognitive performance of 5×FAD mice in conditioned taste aversion and contextual fear conditioning paradigms is impaired around 6 and 9 months of age, respectively (Devi and Ohno, 2010). As noticed in The Jackson Laboratory depository (https://www.jax.org/strain/006554) and in comparison with the original B6/SJL–5×FAD strain, the phenotype in the 5×FAD mice is less pronounced when the mice are backcrossed on the C57BL/6J background, the more commonly used laboratory mouse strain to perform cognitive assessment. Indeed, we have experienced an around 1-month delay in the phenotype when using C57BL/6J–5×FAD mice compared with the original B6/SJL–5×FAD mice (Oakley et al., 2006). Amyloid pathology is delayed, and thus the first cognitive deficits appear around 4.5–5 months of age. The status of the animal housing facility is another parameter to consider. It has recently been demonstrated that gut microbiota composition has an impact on the amyloid pathology development and that AD mice bred in conventional microbiota have more amyloid in the brain than AD mice born in a germ-free environment (Brandscheid et al., 2017; Harach et al., 2017). Consequently, if the mice are bred in specific-pathogen-free or specific- and opportunist-pathogen-free facilities, the behavioral phenotypes could be delayed due to a less aggressive amyloid pathology.

Synaptic plasticity and long-term potentiation

According to the amyloid cascade hypothesis, amyloid accumulation in the AD brain induces numerous neuropathological changes that precede neurodegeneration (Hardy & Selkoe, 2002). LTP is a perfect readout of cellular communication processes that underlie learning and memory. In 5×FAD mice, phenotypic differences between plaque

deposits in the cortex and hippocampus (more dense plaques in the latter) were linked to differences in LTP in these areas (Crouzin et al., 2013). Within the hippocampus of 5×FAD mice, an intense astrogliosis in the dentate gyrus, compared with the CA1 region, was associated with enhanced tonic GABA (γ-aminobutyric acid) current mediated by α5-$GABA_A$ receptors in dentate granule cells (Wu, Guo, Gearing, & Chen, 2014). Blockade of these $GABA_A$ receptors rescued LTP deficits and restored working memory performances in the Y-maze test. Restoration of LTP in 5×FAD mice is thus an important parameter to consider in the evaluation tests of candidate molecules or actors as promising therapeutic targets against AD (Baranger et al., 2016; MacPherson et al., 2017).

Vascular pathology

In recent years, the impact of the cerebral vasculature on the pathophysiology of AD has gained attention. Indeed, a link has been evidenced between AD development and vascular risk factors such as hypertension, obesity, type 2 diabetes, stroke, and atherosclerosis (Cechetto, Hachinski, & Whitehead, 2008). An efficient brain vasculature is necessary for the correct delivery of nutrients and oxygen, but it is also fundamental for its role of detoxification and barrier. Brain vessels help in clearing possible toxic elements, such as the amyloid peptides responsible for plaque formation, and modulate the substances that access the brain thanks to the blood–brain barrier (BBB). This finely organized structure is composed of tight junctions between endothelial cells that strictly control the movements of molecules between the blood and the brain. Several elements, including aging and genetic and epigenetic factors, but also a number of pathologies, determine an impairment of brain vasculature efficiency, with consequent accumulation of toxic species and alterations in brain homeostasis. The 5×FAD mouse model has been demonstrated to accurately reproduce the alterations in brain vasculature typical of AD presymptomatic and symptomatic stages (Giannoni et al., 2016). Thanks to a longitudinal study conducted with in vivo two-photon microscopy associated with classical postmortem analysis, it was evidenced that 5×FAD mice accumulate amyloid around vessels in what is defined as cerebral amyloid angiopathy (CAA), starting at 3 months of age and accumulating over time (Fig. 13.6A). The study confirms a preceding observation of BBB disruption (Kook et al., 2012) near amyloid deposits (Fig. 13.6A–C), also associated with matrix metalloprotease secretion. Indeed, although the association between CAA and cognitive performance is still discussed, the majority of human AD cases show this feature. Another set of cells participating in the neurovascular unit and controlling vessel efficiency and contraction, the pericytes, is also affected in 5×FAD mice. Their expression level changes over time, becoming more important at 9 and 12 months of age, considered late-stage AD in this model. To note, their increased level of expression seems associated with their redistribution, although further studies are needed to better characterize this phenomenon. Pericytes have been proposed as major players in the reparation

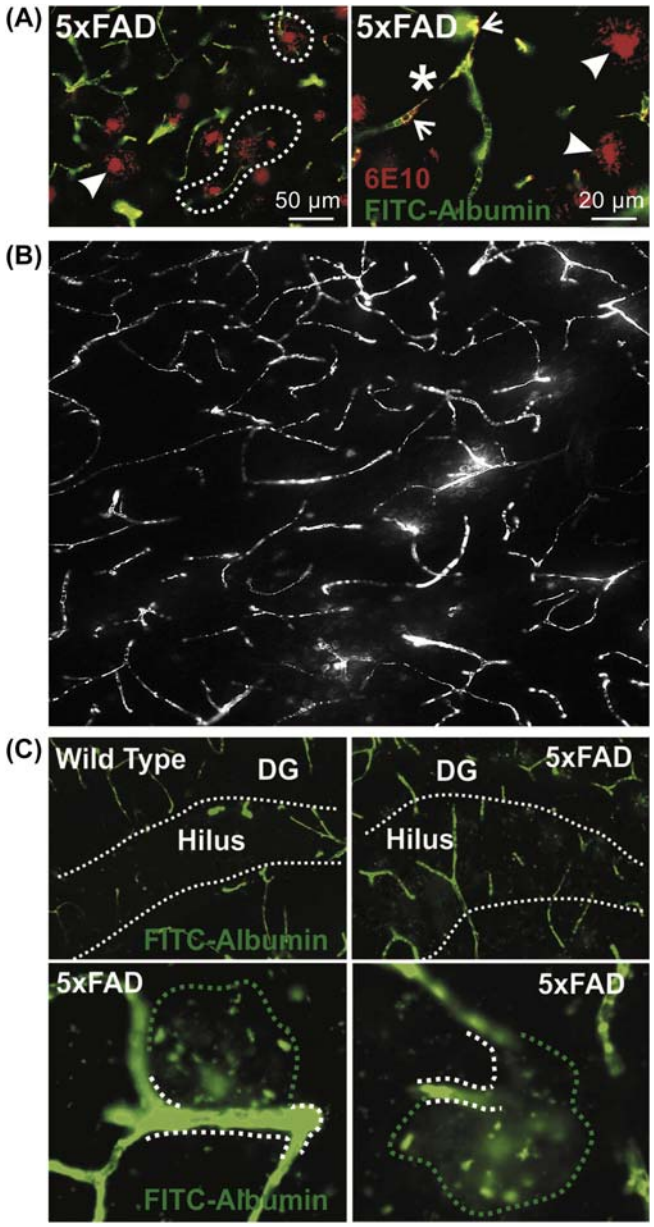


Figure 13.6 Vascular pathology of the 5×FAD mouse model at 12 months of age. (A) Amyloid accumulation is stained using 6E10 anti-Aβ antibody; vasculature is evidenced using fluorescent albumin staining (FITC-albumin). With aging, 5×FAD mice present vascular amyloid deposits (*arrows*) and intense parenchymal Aβ deposits, including dense plaques (*arrowheads*) and diffuse plaques (*dots*). Vascular deposits of Aβ induce vessel damages (*star*) as evidenced by leakages of FITC-albumin staining. (B) Larger view of cortical vasculature and leakages of FITC-albumin. (C) No leakages are detectable in wild-type aged mice (upper left) compared with 5×FAD of the same age (upper right); dots delimit the hilus area of the hippocampus. Bottom: higher magnification of vessel damage and leakage in 5×FAD mice; dots delimit the damaged vessels and associated leakages. *Aβ*, amyloid-β peptide; *DG*, dentate gyrus. *(Courtesy of Dr. Nicola Marchi (IGF, Montpellier).)*

process after a brain insult and are currently under investigation both in human AD cases and in mouse models, as they represent a well-promising target of intervention. Finally, 5×FAD mice reproduce one of the main aspects contributing to AD development: vascular inflammation. A strong microglial activation associated with astrogliosis is evidenced starting at 3 months of age around brain vessels and in strict association with amyloid accumulation and vessel damage. Clusters of reactive inflammatory cells were found correlating with disruption of tight junctions detected by leakages of fluorescein isothiocyanate—albumin. Changes in the expression of inflammation markers (e.g., IL-6) have also been observed in this model (Gurel et al., 2018), probably contributing to vascular inflammation. As for the human pathology, vascular inflammation aggravates with aging in the 5×FAD mouse model.

Neuronal loss/synaptic dysfunctions

The 5×FAD mouse model reproduces the neuronal loss and synaptic dysfunctions that characterize human AD. This feature is particularly interesting, as many other AD animal models do not present any neuronal damages. Interestingly, neuronal loss is particularly evident in the hippocampus and in cortex areas involved in memory formation and processing (Eimer and Vassar, 2013). A profound loss of layer 5 pyramidal neurons is observed in 5×FAD mice starting at 12 months of age (Oakley et al., 2006), while other alterations such as axonal dystrophy and loss of spines and basal dendrites (Buskila, Crowe, & Ellis-Davies, 2013) appear much earlier, around 4—6 months. As behavioral deficits appear around 4 months in this model, such early changes are thought to influence cognitive performance of the mice before late-stage neuronal death occurs. Thanks to electrophysiological studies of such neurons, a direct link between intraneuronal Aβ accumulation, which precedes plaque formation, and neuronal loss has been hypothesized. Presynaptic vesicular machinery, as well as postsynaptic effects, has been highlighted, probably due to the impact of Aβ peptides on glutamatergic conductance. A general consensus is present in the actual literature that considers the presence of amyloid as responsible for synaptic dysfunctions (Marchetti and Marie, 2011) and neuronal loss (Eimer and Vassar, 2013).

Tau pathology

Although the 5×FAD model is considered one of the most exhaustive concerning the reproduction of AD signs, the presence of NFTs is still discussed. While the first description of the 5×FAD model reported the lack of NFTs (Oakley et al., 2006), other more recent papers show a positive staining of paired helical filament tau sites Ser202 and Thr205 with the AT8 antibody, and identify NFTs in the cortex and hippocampus of female 5×FAD mice 6—8 months of age (Tohda, Urano, Umezaki, Nemere, & Kuboyama, 2012). As the antibody used was directed against the human tau, this supposes a cross-reaction with the mouse form. Hyperphosphorylation of tau seems

confirmed in 5×FAD mice (Grinan-Ferre et al., 2016), as stated by mRNA analysis. However, the work of Maarouf and colleagues evidenced no NFTs identified with AT8 antibody (Maarouf et al., 2013). Possible causes of heterogeneity in the observed results could be the age, sex, and genetic background of the animals, as well as methodological and analysis differences (immunohistochemistry protocol, microscope, etc.). Discrepancies among results point to the need of further investigations.

Gender issue

In the human population, the prevalence of AD is higher among women than among men, with a 2:1 women/men ratio. A detailed review of current knowledge on sex-related differences in human AD has been conducted (Ferretti et al., 2018). This excellent work pointed out sex differences in AD patients not only from an epidemiological point of view, but also in clinical manifestations, biomarker patterns, risk factors, and treatment performance. Clearly, researchers have now to consider gender issues in the deciphering of molecular and mechanistic comprehension of AD in preclinical research. A higher Aβ production and deposition has been reported in female 5×FAD mice compared with male mice of the same age (Bhattacharya et al., 2014; Oakley et al., 2006). This feature was also reported in other transgenic AD mouse models such as APP/PS1 or 3×Tg-AD (Callahan et al., 2001; Wang, Tanila, Puolivali, Kadish, & van Groen, 2003). Of interest, despite an increased Aβ burden, female 5×FAD mice (SJL background strain) have a similar life span compared with males, whereas in 3×Tg-AD mice an early mortality in males has been reported (Rae and Brown, 2015). External environment can also induce gender-related pathology, as stress increases Aβ levels in female 5×FAD but not in males (Devi, Alldred, Ginsberg, & Ohno, 2010). Female 5×FAD mice present better olfactory performance than males in olfactory working memory tasks (Roddick et al., 2014). However, odor detection performance may vary in 5×FAD depending on the concentration of the odorant molecules (Roddick, Roberts, Schellinck, & Brown, 2016). As in humans, treatment efficiency can differ between male and female 5×FAD mice. Vitamin D supplementation is efficient only when administered during the symptomatic phase for the females (Landel, Millet, Baranger, Loriod, & Feron, 2016) and only in the early asymptomatic phase for the males (Morello et al., 2018). We also experienced differences in treatment efficiency when a serotonin type 4 receptor agonist was chronically administered to 5×FAD mice. Two-month treatments are sufficient to prevent cognitive deficits in females, whereas longer treatments were necessary to reach similar effects in males (Baranger et al., 2017; Giannoni et al., 2013). Collectively, there is a crucial need to systematically investigate sex differences in mouse models of AD with adapted sizes of groups to obtain an accurate statistical power.

Drawbacks of the 5×FAD mouse model

In this transgenic mouse, the extremely aggressive Aβ pathology, with extensive extracellular plaque formation beginning at 2 months of age, is definitely not in accordance with the time course of human sporadic AD. The slow progressive pathophysiological development of clinical AD in patients is not accurately reproduced in this transgenic mouse model. New models, using injections of adeno-associated viruses in rodents, have been developed to mimic more precisely the initial stages and progression of AD in patients, by controlling the expression in time and space of the transgenes (Audrain et al., 2016).

Advantages of the 5×FAD mouse model

The extreme rapidity of the amyloid neuropathology and associated behavioral deficits make this transgenic mouse a proper research model for early-onset AD (Jawhar, Trawicka, Jenneckens, Bayer, & Wirths, 2012; Oakley et al., 2006). Moreover, the appearance of cognitive deficits as early as 4 months of age renders the 5×FAD mice suitable for evaluating the preventive potential of chronic treatments with disease-modifying molecules (Baranger et al., 2017; Giannoni et al., 2013). Indeed, if the chronic administration of a compound is able to slow Aβ production and delay the appearance of cognitive impairments in 5×FAD mice, which produce the highest level of amyloid, the same compound should be efficient in transgenic mouse models presenting moderate Aβ accumulation. In addition, such a rapidity in obtaining relevant and measurable features in the model induces a reduction in time (and costs) involving animal housing and protocol-related expenses. The ethical aspect of such improvement is a particularly important argument promoting the use of this mouse model.

Conclusion

To conclude, 5×FAD mice represent the more rapid and intense transgenic mouse model of AD, in terms of amyloid pathology. This model recapitulates numerous features of clinical AD in human patients, such as amyloid deposits, gliosis, synaptic degeneration, working memory impairment, reduced anxiety, and selective neuronal loss. Despite controversies due to the early and aggressive plaque development phenotype, this model remains of great interest to preclinically evaluate the disease-modifying potential of new compounds against AD.

Key facts of neurovascular pathology

- A healthy vascular system is mandatory for proper functioning of the brain.
- Amyloid accumulation around vessels (CAA) induces vessel damage in AD.

- Vessel breaks in AD are evidenced by leaks of immunoglobulins in the brain.
- An intense vascular inflammation accompanies vessel damage.
- The neurovascular unit is remodeled in AD with redistribution of the pericytes.

Summary points

- The 5×FAD mouse model reproduces the majority of AD hallmarks, including amyloid plaques, neuronal death, synaptic dysfunctions, CAA, and vessel alterations associated with inflammation.
- As in human AD, the gender issue should be considered in the 5×FAD mouse model, since the pathology is more aggressive in females than in males.
- The rapid and aggressive progression of the pathology in 5×FAD mice is not in accordance with the slow development of sporadic AD in humans.
- The 5×FAD mouse line is a proper research model for early-onset AD.
- This animal model enables a time reduction in the experimental protocols and a diminution of the research costs.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Nicola Marchi for the gift of vasculature images. This work was supported by CNRS, INSERM, Montpellier University, the French Research National Agency ANR (ANR-12-BSV4-008-01 ADAMGUARD), the Association France Alzheimer, the Fondation Vaincre Alzheimer, Région Languedoc Roussillon, and the Fondation Plan Alzheimer. We are grateful for the confocal MRI platform at Montpellier, France.

References

Audrain, M., Fol, R., Dutar, P., Potier, B., Billard, J. M., Flament, J., et al. (2016). Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease progression. *Molecular Neurodegeneration, 11*, 5.

Baranger, K., Giannoni, P., Girard, S. D., Girot, S., Gaven, F., Stephan, D., et al. (2017). Chronic treatments with a 5-HT4 receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology, 126*, 128−141.

Baranger, K., Marchalant, Y., Bonnet, A. E., Crouzin, N., Carrete, A., Paumier, J. M., et al. (2016). MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences, 73*, 217−236.

Bhattacharya, S., Haertel, C., Maelicke, A., & Montag, D. (2014). Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One, 9*. e89454.

Boza-Serrano, A., Yang, Y., Paulus, A., & Deierborg, T. (2018). Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD. *Scientific Reports, 8*, 1550.

Brandscheid, C., Schuck, F., Reinhardt, S., Schafer, K. H., Pietrzik, C. U., Grimm, M., et al. (2017). Altered gut microbiome composition and tryptic activity of the 5xFAD Alzheimer's mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease, 56*, 775−788.

Buskila, Y., Crowe, S. E., & Ellis-Davies, G. C. (2013). Synaptic deficits in layer 5 neurons precede overt structural decay in 5xFAD mice. *Neuroscience, 254*, 152−159.

Callahan, M. J., Lipinski, W. J., Bian, F., Durham, R. A., Pack, A., & Walker, L. C. (2001). Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *American Journal of Pathology, 158*, 1173–1177.

Cechetto, D. F., Hachinski, V., & Whitehead, S. N. (2008). Vascular risk factors and Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics, 8*, 743–750.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., et al. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine, 3*, 67–72.

Crouzin, N., Baranger, K., Cavalier, M., Marchalant, Y., Cohen-Solal, C., Roman, F. S., et al. (2013). Area-specific alterations of synaptic plasticity in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: Dissociation between somatosensory cortex and hippocampus. *PLoS One, 8*, e74667.

De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., et al. (2001). Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Human Molecular Genetics, 10*, 1665–1671.

Devi, L., Alldred, M. J., Ginsberg, S. D., & Ohno, M. (2010). Sex- and brain region-specific acceleration of beta-amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Brain, 3*, 34.

Devi, L., & Ohno, M. (2010). Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *European Journal of Neuroscience, 31*, 110–118.

Eimer, W. A., & Vassar, R. (2013). Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Molecular Neurodegeneration, 8*, 2.

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. *Nature Reviews Neurology, 14*, 457–469.

Fonseca, M. I., Zhou, J., Botto, M., & Tenner, A. J. (2004). Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience, 24*, 6457–6465.

Giannoni, P., Arango-Lievano, M., Neves, I. D., Rousset, M. C., Baranger, K., Rivera, S., et al. (2016). Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease, 88*, 107–117.

Giannoni, P., Gaven, F., de Bundel, D., Baranger, K., Marchetti-Gauthier, E., Roman, F. S., et al. (2013). Early administration of RS 67333, a specific 5-HT4 receptor agonist, prevents amyloidogenesis and behavioral deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience, 5*, 96.

Girard, S. D., Baranger, K., Gauthier, C., Jacquet, M., Bernard, A., Escoffier, G., et al. (2013). Evidence for early cognitive impairment related to frontal cortex in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease, 33*, 781–796.

Grinan-Ferre, C., Sarroca, S., Ivanova, A., Puigoriol-Illamola, D., Aguado, F., Camins, A., et al. (2016). Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging (Albany NY), 8*, 664–684.

Gurel, B., Cansev, M., Sevinc, C., Kelestemur, S., Ocalan, B., Cakir, A., et al. (2018). Early stage alterations in CA1 extracellular region proteins indicate dysregulation of IL6 and iron homeostasis in the 5XFAD Alzheimer's disease mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease, 61*, 1399–1410.

Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K. D., Frisoni, G., et al. (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Scientific Reports, 7*, 41802.

Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science, 297*, 353–356.

Herl, L., Thomas, A. V., Lill, C. M., Banks, M., Deng, A., Jones, P. B., et al. (2009). Mutations in amyloid precursor protein affect its interactions with presenilin/gamma-secretase. *Molecular and Cellular Neuroscience, 41*, 166–174.

Hongpaisan, J., Sun, M. K., & Alkon, D. L. (2011). PKC epsilon activation prevents synaptic loss, Abeta elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *Journal of Neuroscience, 31*, 630–643.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., et al. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science, 274*, 99–102.

Iram, T., Trudler, D., Kain, D., Kanner, S., Galron, R., Vassar, R., et al. (2016). Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in Abeta uptake and in neuroprotection. *Neurobiology of Disease, 96*, 84–94.

Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging, 33*, 196 e29-40.

Jawhar, S., Wirths, O., Schilling, S., Graubner, S., Demuth, H. U., & Bayer, T. A. (2011). Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A{beta} formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *Journal of Biological Chemistry, 286*, 4454–4460.

Johnstone, M., Gearing, A. J., & Miller, K. M. (1999). A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of Neuroimmunology, 93*, 182–193.

Kimura, N., Takahashi, M., Tashiro, T., & Terao, K. (2006). Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: Rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration. *Journal of Neuroscience Research, 84*, 782–789.

Kook, S. Y., Hong, H. S., Moon, M., Ha, C. M., Chang, S., & Mook-Jung, I. (2012). Abeta(1)(-)(4)(2)-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca(2)(+)-calcineurin signaling. *Journal of Neuroscience, 32*, 8845–8854.

Landel, V., Millet, P., Baranger, K., Loriod, B., & Feron, F. (2016). Vitamin D interacts with Esr1 and Igf1 to regulate molecular pathways relevant to Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration, 11*, 22.

Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A. J., Penke, B., et al. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *The Journal of Immunology, 188*, 1098–1107.

Maarouf, C. L., Kokjohn, T. A., Whiteside, C. M., Macias, M. P., Kalback, W. M., Sabbagh, M. N., et al. (2013). Molecular differences and similarities between Alzheimer's disease and the 5XFAD transgenic mouse model of amyloidosis. *Biochemistry Insights, 6*, 1–10.

MacPherson, K. P., Sompol, P., Kannarkat, G. T., Chang, J., Sniffen, L., Wildner, M. E., et al. (2017). Peripheral administration of the soluble TNF inhibitor XPro1595 modifies brain immune cell profiles, decreases beta-amyloid plaque load, and rescues impaired long-term potentiation in 5xFAD mice. *Neurobiology of Disease, 102*, 81–95.

Marchetti, C., & Marie, H. (2011). Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: What have we learned so far from transgenic models? *Reviews in the Neurosciences, 22*, 373–402.

Morello, M., Landel, V., Lacassagne, E., Baranger, K., Annweiler, C., Feron, F., et al. (2018). Vitamin D improves neurogenesis and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*.

Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience, 26*, 10129–10140.

Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology, 173*, 649–665.

Perlmutter, L. S., Barron, E., & Chui, H. C. (1990). Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters, 119*, 32–36.

Rae, E. A., & Brown, R. E. (2015). The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 57*, 238–251.

Roddick, K. M., Roberts, A. D., Schellinck, H. M., & Brown, R. E. (2016). Sex and genotype differences in odor detection in the 3xTg-AD and 5XFAD mouse models of Alzheimer's disease at 6 Months of age. *Chemical Senses, 41*, 433–440.

Roddick, K. M., Schellinck, H. M., & Brown, R. E. (2014). Olfactory delayed matching to sample performance in mice: Sex differences in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research, 270*, 165–170.

Schaeffer, E. L., Figueiro, M., & Gattaz, W. F. (2011). Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics, 66*(Suppl. 1), 45–54.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine, 2*, 864–870.

Selkoe, D. J., & Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 43*, 545–584.

Spangenberg, E. E., Lee, R. J., Najafi, A. R., Rice, R. A., Elmore, M. R., Blurton-Jones, M., et al. (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-beta pathology. *Brain, 139*, 1265–1281.

Tohda, C., Urano, T., Umezaki, M., Nemere, I., & Kuboyama, T. (2012). Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D(3)-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Scientific Reports, 2*, 535.

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. *Neurobiology of Disease, 14*, 318–327.

Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., & Chen, G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's [corrected] disease model. *Nature Communications, 5*, 4159.

Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., et al. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nature Medicine, 9*, 453–457.

PARTIE 2

CARACTERISATION IN VIVO D'UN LIGAND MULTI-CIBLE ET ANALYSE DE SON EFFET SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL

La maladie d'Alzheimer (MA) étant une pathologie neurodégénérative incurable, il est urgent de développer de nouveaux traitements thérapeutiques. Face à la complexité et à l'hétérogénéité de cette maladie, l'équipe a conçu en collaboration avec le groupe du Pr. P. Dallemagne (Université de Caen) des ligands capables d'agir simultanément sur plusieurs cibles présentant un intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de la MA. Ces molécules sont appelées ligands multi-cibles ou MTDL (*multi-target-directed ligand*).

Un premier composé à double action développé en 2014, le donécopride, a montré des effets prometteurs *in vitro* et dans le modèle murin d'amyloïdose 5XFAD C57BL/6 (Lecoutey et al., 2014; Rochais et al., 2020, 2015).

Le donécopride est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE) qui est la cible majeure des traitements actuellement sur le marché. Ce composé est en capacité de se fixer au site CAS (site catalytique) de cette enzyme et d'inhiber son activité d'hydrolyse permettant ainsi de rehausser le taux d'acétylcholine dans la fente synaptique et de restaurer la neurotransmission cholinergique qui est défaillante chez les patients atteints de la MA. Par ailleurs, le donécopride a été conçu de manière à se fixer également au site PAS (site anionique périphérique) de l'acétylcholinestérase impliqué dans l'agrégation des peptides β-amyloïdes (Inestrosa et al., 1996). La liaison au site PAS procure au donécopride une capacité à empêcher l'agrégation amyloïde.

Le donécopride est un agoniste de sa seconde cible : le récepteur sérotoninergique 5-HT_4. L'activation de ce récepteur promeut le clivage non-amyloïdogène de l'APP et prévient la production des peptides β-amyloïdes, via son action sur l'α-sécrétase ADAM10 (Cochet et al., 2013b). Par ailleurs, l'activation du récepteur 5-HT_4 augmente la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique (Consolo et al., 1994).

Cette double action permet donc au donécopride d'avoir d'une part des effets bénéfiques sur les symptômes de la pathologie mais également des effets dits « *disease-modifying* » qui impactent l'évolution de la maladie.

Une nouvelle série de composés à triple action a ensuite été synthétisée. La troisième cible de ces molécules est le récepteur sérotoninergique 5-HT_6 sur lequel elles possèdent une activité antagoniste. L'inhibition de ce récepteur est une piste d'intérêt thérapeutique dans le contexte de la MA, car elle engendre des effets pro-cognitifs (Meffre et al., 2012) *via* l'inhibition indirecte de la voie mTOR à laquelle le récepteur est couplé. Le blocage du récepteur 5-HT_6

semble également corriger les altérations des mécanismes d'autophagie observés dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Oddo, 2012).

Une preuve de concept de la capacité à générer de telles molécules à triple action a été présentée en 2019 (Hatat et al., 2019b). Le composé 10 publié dans cette étude présentait des propriétés similaires au donécopride vis-à-vis de l'AChE et du récepteur 5-HT_4, mais son activité antagoniste du récepteur 5-HT_6 était modérée.

Une nouvelle molécule, appelée la donécopirdine, a ainsi alors été synthétisée. Elle a montré être aussi efficace *in vitro* sur les récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_6 que les composés de référence RS-67333 et l'idalopirdine, respectivement agoniste et antagoniste des récepteurs. La donécopirdine présente également une activité inhibitrice de l'AChE *in vitro*, qui est moins importante que celle du composé précédemment publié, mais qui reste très acceptable pour une molécule à triple action. Les résultats de la caractérisation pharmacologique de la donécopirdine sont présentés dans l'article ci-après.

Nous avons ensuite caractérisé *in vivo* dans le modèle murin 5XFAD l'effet d'un traitement préventif et d'un traitement curatif avec la donécopirdine sur les performances cognitives et la physiopathologie des animaux. En parallèle, l'équipe ayant obtenu des résultats préliminaires montrant une dysbiose du microbiote intestinal dans ce modèle, nous avons également caractérisé la composition bactérienne du microbiote intestinal et le métabolome intestinal et sanguin suite à ces traitements afin d'évaluer l'impact possible de nos composés pharmacologiques sur le microbiote intestinal.

Le Dr. B. Hatat et moi-même sommes co-premier auteur de ce papier en préparation. Ci-après la contribution de chacune dans l'article :

Bérénice Hatat :

- Synthèse chimique de la donécopirdine
- Analyses pharmacologiques *in vitro* sur les récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_6
- Administration *in vivo* des composés pharmacologiques en traitement chronique
- Test du labyrinthe de Barnes (traitement chronique)
- Immunohistochimie des plaques amyloïdes compactes

Caroline Ismeurt :

- Administration *in vivo* des composés pharmacologiques en traitement chronique et subchronique
- Test de reconnaissance du nouvel objet (traitements chronique et subchronique)
- Immunohistochimie des plaques amyloïdes compactes
- Western blot (traitements chronique et subchronique)
- ELISA (traitements chronique et subchronique)
- Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase suite au traitement chronique
- Analyse des résultats de métagénomique

Donecopirdine, a multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent cognitive and pathological impairments in 5XFAD mice: complete evaluation including metabolome and microbiome characterization.

En préparation.

Donecopirdine, a multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent cognitive and pathological impairments in 5XFAD mice: complete evaluation including metabolome and microbiome characterization.

Short title: **A Triple MTDL is better than donepezil**

Caroline Ismeurt[a#], Bérénice Hatat[a,b,c#], Caroline Lanthier[b,c], Audrey Davis[b,c], Cédric Lecoutey[b,c], Kevin Baranger[e], Thomas Freret[b,d], Philippe Marin[a], Santiago Rivera[e], Benjamin Lelouvier[f], Michel Boulouard[b,d,†], Christophe Rochais[b,c,†], Patrick Dallemagne[b,c,*], Sylvie Claeysen[a,*]

[a]IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, F-34094, Montpellier, France
[b]Normandie Université, F-14032 Caen, France
[c]UNICAEN, CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie), F-14032 Caen, France
[d]UNICAEN, INSERM U1075 COMETE F-14032 Caen, France
[e]Aix-Marseille University, CNRS, INP, Inst Neurophysiopathol, F-13344, Marseille, France
[f]VAIOMER, F-31670, Labège, France

[#]Caroline Ismeurt and Bérénice Hatat contributed equally to this work.
[†]Michel Boulouard and Christophe Rochais contributed equally to this work.
[*]Patrick Dallemagne and Sylvie Claeysen contributed equally to this work.

Corresponding authors:
Patrick Dallemagne
CERMN – EA4258
Boulevard Becquerel, 14032 Caen, France
+33 231 566 813
Email: patrick.dallemagne@unicaen.fr

Sylvie Claeysen
IGF – CNRS UMR5203 – INSERM U1191 – Univ. Montpellier
141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France
+33 434 359 215
Email: sylvie.claeysen@igf.cnrs.fr

Author contributions: T.F., M.B., C.R., P.D., and S.C. designed research; B.H., C.I., C.L., K.B., A.D. and C.L. performed research; T.F., P.M., S.R., B.L, M.B., C.R., P.D., and S.C. analyzed data; and C.R., S.C., and P.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia which mainly affects the elderly. Mostly designed to target cholinergic and glutamatergic neurotransmission, current drugs are only improving symptoms while the pathology is still spreading all over the brain. Even if efforts are done to find treatment against amyloid aggregation and neurofibrillary tangles, the two main hallmarks of AD, most of these drugs have failed in clinical trials [1, 2]. This could be explained by the selectivity of such drugs which are designed to be active against one biological target [3]. However, AD is a multifactorial disease and involved the abnormality of several systems. Therefore, targeting more than one biological has become essential in order to have a disease-modifying effect [4]. Combining several drugs can be managed using the multiple-medication therapy (MMT) or the multiple-compound medication (MCM) but these therapeutic strategies are always related to poor patient compliance, drug-drug interactions and problems of bioavailability and metabolism. To avoid this kind of inconvenience, new drugs known as multi-target-directed ligands (MTDLs) are being developed [5]. MTDLs are sole molecules which are designed to be active against several biological targets with different mechanisms of action. Besides making easier the pharmacokinetic studies, it has been demonstrated that they show synergistic effects on their targets. Their use seems to be really promising in the treatment of neurodegenerative disorders such as AD [6, 7].

In a previous work, we described the synthesis of dual MTDLs combining acetylcholinesterase inhibitory (AChEI) activity with serotonergic type 4 receptors (5-HT_4R) agonism [8, 9] and also dual compounds behaving as antagonists of serotonergic type 6 receptors (5-HT_6R) and agonists of serotonergic type 4 receptors [10]. Indeed, chronic administration of 5-HT_4R agonists leads to a decrease of the amyloid pathology and cerebral inflammation and is also able to prevent cognitive deficits in 5XFAD mice, an AD mouse model [11, 12]. These disease-modifying effects are linked to the promotion of the α-secretase cleavage of APP that induces the production of sAPPα, a neurotrophic and neuroprotective soluble fragment, and precludes the production of the amyloid-β peptide [13-15]. The 5-HT_6 receptor, another serotonin receptor subtype, has also aroused curiosity for the treatment of AD. Unlike 5-HT_4R, it is its blockade which can lead to beneficial effects on cognition [16-18]. In rodents, the administration of 5-HT_6R antagonists is followed by improved cognitive performance in several behavioral tests [19-22]. Its activity is thought to be mediated by the release of neurotransmitters such as acetylcholine and glutamate [23-26]. Inhibition of the mTOR pathway may also be involved in the procognitive effects [27].

By virtue of these properties, we consider that engaging these three therapeutic targets in the treatment of AD is a reliable strategy. Indeed, we recently reported the synthesis of new MTDLs designed to be at the same time AChEI, 5-HT_4R agonist and 5-HT_6R inverse agonist [28]. In this study, the first *in vivo* experiments using compound **5k**/**10** have demonstrated promising results which conducted us at designing donecopirdine. This compound, with a slight decrease in AChE affinity, presented better affinity for the serotoninergic receptors 5-HT_4 and 5-HT_6 compared to compound **5k**/**10**. The present work aimed at demonstrating the potency of this new MTDL to prevent AD in cellular and animal models. We conducted here a complete evaluation of donecopirdine, in comparison with donepezil, the current drug that has been approved against AD. This assessment includes the determination of changes induced by the two drugs on the microbiome and metabolome of the 5XFAD mice.

2. Material and Methods

2.1. Chemistry

All chemical reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. Melting points were determined on a Kofler melting point apparatus. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a BRUKER AVANCE III 400MHz with chemical shifts expressed in parts per million (in chloroform-d, methanol-d_4 or DMSO-d_6) downfield from TMS as an internal standard and coupling in Hertz. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer BX FT-IR apparatus using KBr pellets. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray on a Bruker maXis. The purities of all tested compounds were analyzed by LC−MS, with the purity all being higher than 95%. Analyses were performed using a Waters Alliance 2695 as separating module (column XBridge C18 2.5 µM/4.6 x 50 mM) using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H_2O, B = CH_3CN; each containing HCOOH: 0.1%). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-(2-bromo-5-hydroxybenzyl)piperidin-4-yl-propan-1-one (Donecopirdine). Yellow poder (26%); ^{1}H NMR (MeOD-d4, 399.8 MHz) δ 7.65 (s, 1H), 7.32 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8.7 Hz, 1H), 6.96 (d, $^{4}J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H), 6.62 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 8.7 Hz, $^{4}J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 2.97-2.88 (m, 4H), 2.17-2.11 (m, 2H), 1.72-1.70 (m, 2H), 1.58-1.53 (m, 2H), 1.34-1.28 (m, 3H); ^{13}C NMR (MeOD-d4, 100 MHz) δ 201.1, 161.7, 158.2, 151.7, 138.8, 134.3, 132.9, 119.2, 117.9, 117.2, 114.6, 111.6, 98.1, 61.9, 56.1, 55.0, 41.7, 36.7, 33.0, 32.8; MS (m/z) $[M+H]^+$ 481.59 – 483.58 – 485.59; HRMS (m/z) calculated for $C_{22}H_{27}N_2O_3ClBr$ $[M+H]^-$ 481.0894, found 481.0889;

2.2. *In vitro* biological studies

2.2.1. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT$_4$R

The method was validated from saturation studies: six concentrations of [^{3}H]-GR113808 (Perkin Elmer) were used to give final concentrations of 0.0625-2 nM, and nonspecific binding of [^{3}H]-GR113808 was defined in the presence of 30 µM serotonin to determine the K_d and the B_{max}. For competition studies, 2.5 µg of proteins (5-$HT_{4(b)}$ membrane preparations, HTS110M, Millipore. Millipore's 5-$HT_{4(b)}$ membrane preparations are crude

membrane preparations made from their proprietary stable recombinant cell lines to ensure high-level of GPCR surface expression) were incubated in duplicate at 25°C for 60 min in the absence or the presence of 10^{-6} or 10^{-8} M of each drug (RS 67333 was used as a reference standard) and 0.2 nM [^{3}H]-GR113808 (VT 240, ViTrax) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25°C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) presoaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 4 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4°C). Non-specific binding was evaluated in parallel in the presence of 30 µM serotonin.
Affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the EBDA-Ligand software and expressed as $K_i \pm SD$.

2.2.2. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT$_6$R

Drugs were evaluated through their possibility to compete for the binding of [^{3}H]-LSD on membranes of HEK-293 cells transiently expressing the human 5-HT$_6$ receptor (ref. RBHS6M, Perkin Elmer Life Sciences). In brief, 4 µg of proteins were incubated at 37°C for 60 min in duplicate in the absence or the presence of 10^{-7} M of each drug (idalopirdine was used as a reference standard) and 2.5 nM [^{3}H]-LSD (ref. NET638250UC, Perkin Elmer Life Sciences), in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 10 mM $MgCl_2$ and 0.5 mM EDTA. At the end of the incubation, the homogenates were then filtered through Whatman GF/C filters and washed five times with ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer. Non-specific binding was evaluated in the presence of 100 µM serotonin. Radioactivity associated to proteins was then quantified and expressed as the percentage of inhibition of the drugs under study.

The method was validated from saturation studies: 6 concentrations of [^{3}H]-LSD were used to give final concentrations of 0.25-8 nM, non-specific binding of [^{3}H]-LSD was defined in the presence of 100 µM serotonin to determine the K_d and the B_{max}.

Affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the EBDA-Ligand software and expressed as $K_i \pm SD$.

2.2.3. Determination of cAMP production

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected with plasmid encoding HA-tagged 5-HT$_4$R or HA-tagged 5-HT$_6$R, then seeded in 96-well plates (16,000 cells/well).

5-HT_4R-induced cAMP production: 24 hrs after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT_4R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO 20 1724, at 37°C in 100 µL of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM $CaCl_2$; 0.5 mM $MgCl_2$; 0.1% glucose; 0.1% BSA). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%).

Blockade of the 5-HT_6R-induced cAMP production: 24 hrs after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT_6R ligands at 37°C in 50 µl of HBS. After 7 min, 5-HT (5.10^{-7}M final concentration) in the presence of 0.1 mM (final concentration) of RO 20 1724, in 50 µl HBS, was added to the wells. After 10 min at 37°C, cells were then lysed by addition of 100µl of Triton-X100 (0.1%).

Quantification of cAMP production was performed by HTRF® by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

Idalopirdine was synthesized by the CERMN. RS 67333 (1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-(1-butyl-4-piperidinyl)-1-propa-none), and SB 271046 (5-Chloro-N-[4-methoxy-3-(1-piperazinyl)phenyl]-3-methyl-benzo[b]thiophen-2-sulfonamide) were purchased from Tocris Bioscience (R&D Systems Europe, Lille, France).

2.2.4. Determination of sAPPα production in transfected cells

COS-7 cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged mouse 5-HT_4 receptor and secreted placental alkaline phosphatase (SEAP, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France)-tagged mouse APP695 (generous gift of Dr Bernadette Allinquant), as previously described [15], and then seeded in 24-well plates (300,000 cells/well). Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with the appropriate drug concentration for 30 min, then culture supernatants were collected and SEAP activity measured by adding the chromogenic substrate *p*-nitrophenyl phosphate disodium hexahydrate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions. The reaction readout was performed at 405 nm (colorimetric assay) using an Infinite 200 multimode microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). This technique measures all secreted soluble forms of APP and does not discriminate between sAPPα and sAPPβ.

2.2.5. *In vitro* tests of AChE biological activity

Inhibitory capacity of compounds on AChE biological activity was evaluated through the use of the spectrometric method of Ellman [29]. Acetylthiocholine iodide and 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) were purchased from Sigma Aldrich. AChE from human

erythrocytes (buffered aqueous solution, ≥ 500 units/mg protein (BCA), Sigma Aldrich) was diluted in 20 mM HEPES buffer pH 8, 0.1% Triton X-100 such as to have enzyme solution with 0.25 unit/mL enzyme activity. In the procedure, 100 µL of 0.3 mM DTNB dissolved in phosphate buffer pH 7.4 were added into the 96 wells plate followed by 50 µL of test compound solution and 50 µL of enzyme (0.05 U final). After 5 min of preincubation at 25°C, the reaction was then initiated by the injection of 50 µL of 10 mM acetylthiocholine iodide solution. The hydrolysis of acetylthiocholine was monitored by the formation of yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as the result of the reaction of DTNB with thiocholine, released by the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine, at a wavelength of 412 nm using a 96-well microplate plate reader (TECAN Infinite M200, Lyon, France). Test compounds were dissolved in analytical grade DMSO. Donepezil (DPZ) was used as a reference standard. The rate of absorbance increase at 412 nm was followed every minute for 10 min. Assays were performed with a blank containing all components except acetylthiocholine, in order to account for non-enzymatic reaction. The reaction slopes were compared and the percent inhibition due to the presence of test compounds was calculated by the following expression: 100 - (vi/v0x100) where vi is the rate calculated in the presence of inhibitor and v0 is the enzyme activity.

First screening of AChE activity was carried out at a 10^{-6} M concentration of compounds under study. For the compounds with significant inhibition (≥ 50%), IC_{50} values were determined graphically by plotting the % inhibition versus the logarithm of six inhibitor concentrations in the assay solution using the Origin software.

2.3. *In vivo* biological studies

2.3.1. Animals used in the study

2.3.1.1. Toxicology, locomotion and spatial working memory

Adult male NMRI mice (3 months old, weighing 35-40g) from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used to perform experiments. Mice were housed by ten in standard polycarbonate cages in standard controlled conditions (22 ±2 °C, 55 ± 10% humidity) with a reversed 12 h light/dark cycle (light on at 7 pm). Food and water were available ad libitum in the home cage. All experiments were conducted (between 9 am and 3 pm) during the active - dark - phase of the cycle and were in agreement with the European Directives and French law on animal experimentation (personal authorization n° 14-17 for MB and 14-60 for TF).

2.3.1.2. Chronic and subchronic treatments

All animal care and experimental procedures were conducted in accordance with National and European regulations (EU directive N°2010/63) and care guidelines of

Montpellier University (authorization B34-417-24, approved protocol #21223). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of mice used. The generation of 5XFAD mice was described previously (Oakley et al., 2006). These transgenic mice overexpress both human APP (695) harboring the Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V) and London (V717I) familial AD (FAD) mutations and human Presenilin 1 (PS1) harboring the two FAD mutations M146L and L286V. Expression of both transgenes is regulated by neuronal-specific elements of the mouse Thy1 promoter. The 5XFAD strain (B6/SJL genetic background) was backcrossed over more than 10 generation in the C57BL/6J genetic background by crossing hemizygous transgenic mice with C57BL/6J F1 breeders (Janvier). 5XFAD heterozygous transgenic mice were used for the experiments and Wild type (WT) littermates as controls. All animals were genotyped by PCR using tail genomic DNA. SOPF WT and 5XFAD female C57BL/6 mice (6-week-old) were bred in the Plateau Central d'Elevage et d'Archivage (CNRS, MONTPELLIER). Conventional housed mice (6-month-old) were bred in the Faculté de Médicine Secteur Nord (permit number: D 13 055 08, CNRS, Marseille). Transgenic and WT mice were experimented in our animal facility, had access to food and water ad libitum and were housed under a 12 h light-dark cycle at 22–24◦C. Female 5XFAD mice were used in this study. For each experiment, the age of mice is indicated in weeks (with a 4-day range).

2.3.2. Drugs and animal treatments

2.3.2.1. Toxicology, locomotion and spatial working memory

Amphetamine (+)-α-Methylphenethylamine hemisulfate, chlorpromazine hydrochloride, imipramine hydrochloride and scopolamine hydrobromide were purchased from Sigma (France). All those pharmacological compounds were dissolved in NaCl 0.9% as the vehicle and were administered i.p. 30 min before tests, except scopolamine which was subcutaneously administered 20 min before spontaneous alternation test.

2.3.2.2. Chronic treatments

Donecopirdine and donepezil were synthetized in CERMN, resuspended in DMSO, stored at -20°C and freshly diluted to 0.15 mg/ml in 0.9% NaCl prior administration.

5XFAD mice and WT littermates received chronic intraperitoneal treatments with drugs or vehicle (1 mg/kg), twice a week and for 18 weeks, from 1.5 to 6 month-old (Supplementary figure 1A). At the end of the protocol, mice were anesthetized with a mixture of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine in saline solution and perfused transcardially with PBS. Brains were quickly isolated on ice, the cortex and hippocampus were dissected from one hemisphere

and stored at -80°C for biochemical analysis, while the other hemisphere was post-fixed in 4% PFA for immunohistochemistry.

2.3.2.3. Subchronic treatments

Donecopirdine and Donepezil were synthetized in CERMN, resuspended in DMSO as mentioned above and freshly diluted to 0.2 mg/mL in 0.9% NaCl prior administration.
5XFAD mice and WT littermates received intraperitoneal treatments with drugs or vehicle (1.5 mg/kg), twice a day for 10 days, starting at 5 month-old (Supplementary figure 1B). At the end of the protocol, mice were decapitated, heads were snap-frozen in liquid nitrogen, and the cortex and hippocampus were dissected from one hemisphere and stored at -80°C for biochemical analysis.

2.3.3. CNS-activity and acute toxicity test

Behavioral and neurological changes induced by graded doses (1, 10, 100 mg/kg) of the tested derivatives were evaluated in mice, in groups of four, by a standardized observation technique at different times (30 min, 3 and 24 h) after intraperitoneal administration. Major changes of behavioral data (for example, hypo- or hyperactivity, ataxia, tremors, convulsion, etc.) were noted in comparison to the control group. The approximate DL_{50} of the compounds were also calculated through the quantification of mortality after 24 h. Amphetamine (2 mg/kg), chlorpromazine (10 mg/kg) were used as stimulant and depressive references, respectively.

2.3.4. Locomotor activity

Locomotion of mice was measured using an actimeter (Imetronic®) through infrared detection. Eight individual removable polycarbonate cages (21-cm length, 7-cm wide and 12-cm high), where each mouse was placed, are disposed in the actimeter. Locomotor activity was measured by recording the number of interruption of beams of the red light over a period of 30 min through an attached recording system to the actimeter. Donecopirdine was tested at 1, 3 and 10 mg/kg. Amphetamine (2 mg/kg), chlorpromazine (3 mg/kg) were used as stimulant and depressive references, respectively.

2.3.5. Spatial working memory

Anti-amnesiant activity of tested compounds was evaluated by reversal of scopolamine (0.5 mg/kg) -induced deficit on spontaneous alternation behavior in the Y maze test. The Y maze made of grey plastic consisted of three equally spaced arms (21-cm long, 7-cm wide with walls 15-cm high). The mouse was placed at the end of one of the arms and allowed to move

freely through the maze during a 5 min session while the sequence of arm entries was recorded by an observer. An arm entry was scored when all four feet crossed into the arm. An alternation was defined as entries into all three arms on a consecutive occasion. The number of possible alternation is thus the total number of arm entries minus two; the percentage of alternation was calculated as (actual alternation/possible alternation) [30]. Donecopirdine was tested at 0.3, 1 and 3 mg/kg.

2.3.6. Novel object recognition test

The recognition memory of mice was tested using the novel object recognition (NOR) test [31]. Animals were extensively handled during drug treatment prior to the test onset. Testing was carried out in a V-maze (5-cm wide, 33-cm length, 15-cm height) or a rectangular arena (30-cm wide, 40-cm length, 30-cm height) placed in a dimly lit room (20-30 Lx). On day 1, habituation session, each mouse was habituated to the empty V-maze/arena for 5 min. On day 2, training session, mice were given 10 min to explore two objects (familiar objects) positioned at the bottom of each arm in the V-maze or in the diagonals of the arena. Mice were then returned to their home cage and 24 h later, on day 3, went through a 5 min restitution session in which one of the two (familiar) objects was replaced by a new one (novel). All sessions were video-recorded and blindly analyzed.

2.3.7. Barnes Maze test

Learning and spatial memory performance were assessed using the Barnes maze. The Barnes maze consisted of a white circular PVC slab (92-cm diameter) with twenty circular holes (5-cm diameter), elevated 100 cm above the ground. On habituation session, each mouse was placed in a black cylinder in the center of the Barnes maze during 30 s while aversive stimuli (85db fire alarm noise and 320 lux light) were activated. Mice were then slowly guided to the target hole with the hands. At the target hole, mice were given 1 min to enter by themselves, and then they were nudged with the hands to enter. Mice were left alone in the escape cage for 1 min without aversive stimuli and then returned in their home cage. On training sessions, each mouse was placed again in the center of the Barnes maze for 15 s with aversive stimuli. Then, the black cylinder was removed and mice were given 2 min to explore and enter (or not) the escape cage. If mice found the escape cage and enter it during the 2 min allowed, they were allowed to stay in it for 1 min. If they didn't find the escape cage or found it but didn't enter, they were guided to it with the hands and nudged to enter in it. Then, they were left alone in the escape cage for 1 min and taken back to their home cage. Every time a mouse

entered the escape cage, with help or not, noise and light were cut off. Three training sessions were performed on day 1 and two training sessions on day 2. On day 3, mice were left in their home cage without any training session. During the probe test on day 4, mice were placed again in the center of the Barnes maze for 15 s with noise and light on and the escape cage was removed. Mice were given 2 min to explore the Barnes maze. All sessions were video-recorded and tracked using Noldus EthoVision software.

2.3.8. Immunohistochemistry

Thirty-micrometer-thick sections were cut using a vibratome (Leica VT1000 S) and stored in cryoprotectant medium at -20°C. For the labeling of amyloid plaques and astrogliosis, three sections/animal of hippocampus and entorhinal cortex (coordinates from the bregma: hippocampus = -1.94 mm, entorhinal cortex = -3.08 mm) were extensively washed in TBS, incubated in blocking solution (TBS; 3% BSA; 0.1% Triton X-100) for 1 hour, then incubated with the polyclonal rabbit anti-GFAP antibody (1:1000, Z0334, Dako, Les Ullis, France) in TBS; 1% BSA; 0,1% Triton X-100 at 4°C overnight. Sections were then incubated with Thioflavin T solution (#T3516-5G, Sigma-Aldrich) (final concentration: 1 mg/mL in the antibody buffer) for 15 minutes. After washing in 70% ethanol for 5 minutes and in TBS for 30 minutes, sections were incubated with the AlexaFluor 594 goat anti-rabbit antibody (1:1000, A11012, Life Technologies) for 2 hours. After TBS washes and cell nuclei staining with Hoechst dye (1:5000, Life Technologies, Saint Aubin, France) for 5 minutes, sections were mounted on poly-L-lysine slides. Images were acquired with an AxioImager Z1 microscope (Carl Zeiss S.A.S., Marly le Roi, France). All analysis was performed blindly and automatically with the Image J software. For Thioflavin T and GFAP staining, data are respectively presented as the mean number of particles per mm^2 and as the mean intensity in area fractions. For representative images, mosaic sequential scans with a 10X objective were taken.

2.3.9. Western blotting

Cortex samples were sonicated (Vibracell 75185) in 800µL lysis buffer containing 20mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM $Na_4P_2O_7$, 2 mM Na_3VO_4, 50 mM β-glycerophosphate and a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) on ice and centrifuged (20.000 g, 20 min, 4°C). The proteins in the resulting supernatants were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to PVDF membrane. The membranes were blocked with non-fat dried-milk for 1 hour, probed with primary antibodies for GFAP (1:5000, Z0334, Dako) and Iba1 (1:2000, NBP2-19019, NovusBio) overnight at 4°C and then

with secondary horseradish peroxidase antibodies for 2 hours. Actin detection using anti-actin-HRP antibody (1:5000, SC-47778, SantaCruz) was used as the loading control. Proteins bands were visualized with an ECL detection kit, and band intensity was quantified with the Image J software.

2.3.10. Quantification of APP cleavage products

Hippocampus samples were homogenized as described before [11]. Briefly, samples were homogenized on ice in 400 µL lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, and a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). The resulting homogenates were centrifuged (540.000 g, 20 min, 4°C) and supernatants (soluble fraction) were stored at -80°C. Pellets were resuspended by sonication in 400 µL of 6 M Guanidine-HCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, and centrifuged (265.000 g, 20 min, 4°C). Supernatants (insoluble fraction) were stored at -80°C.

ELISA kits for human $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$, sAPPα and sAPPβ-swedish (#JP27713, #JP27711, #JP27734, #JP27733, IBL International) and mouse-rat $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ (#JP27720, #JP27721) were used according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to the protein concentration of each sample.

2.3.10. Quantification of AChE activity in brain samples

The amount of active AChE units was determined following the method of Ellman [29]. Briefly, cortex homogenates prepared in "Western blotting" section were diluted 1:10 in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and 50 µL were loaded in duplicate in a 96-well plate. 50µL of a 1:1 mix of 2 mM acetylthiocholine iodide (A5751, Sigma-Aldrich) diluted in milli-Q water and 0.2mM DTNB (D218200, Sigma-Aldrich) diluted in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 were added to the wells. Standard curve was performed using AChE enzyme (C3389, Sigma-Aldrich) diluted in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and 1% BSA at 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 mU/mL. After a 5-min incubation time in the dark, the absorption was measured at 405 nm. Results were normalized to the protein concentration of each sample.

2.3.9. 16S targeted metagenomics

The bacterial population present in the samples has been determined using next generation high throughput sequencing of variable regions of the 16S rRNA bacterial gene, with a specific protocol established by Vaiomer. The metagenomics workflow was used to classify organisms from a metagenomic sample by amplifying specific regions in the 16S ribosomal RNA gene

and was exclusive to bacteria. Extraction steps, library construction and sequencing and bioinformatics pipeline have been described in [32].

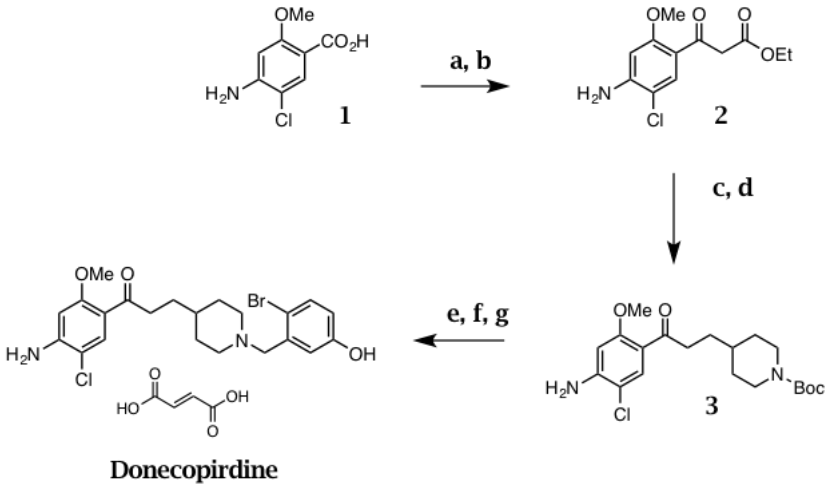
2.3.10. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SEM. Significant effects of treatments were determined by ANOVA analysis followed by post hoc test (Bonferroni's or LSD Fisher's) in the case of multiple comparison groups, as indicated in the legends of the figures. In case of missing values, a mixed-effect model with Geisser-Greenhouse correction, followed by Dunnett's test was used. When the distribution was not Gaussian, non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test were used. In all other cases, the unpaired Student's t test was used. For all statistical tests, $p < 0.05$ was considered significant. Analysis was performed with Statview® software and GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3. Results

3.1 Synthesis of donecopirdine

Donecopirdine was obtained following a multi-step sequence which was previously reported in [28]. Briefly, this sequence starts with the carbonyldiimidazole (CDI) activation of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (1) (Scheme 1) [9] followed by the synthesis of a β-ketoester (2) with a 62% yield. A nucleophilic substitution with *N*-Boc 4-(iodomethyl)piperidine allowed us to install the methylpiperidine moiety at room temperature in order to prevent a double substitution from happening. This nucleophilic substitution was immediately followed by a saponification–decarboxylation with hydroalcoholic potassium hydroxide which gave **3** in a 86% yield. Finally, donecopirdine was obtained by releasing the nitrogen atom through TFA-*N*-deprotection of **3**, immediately followed by another nucleophilic substitution with 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol. The fumaric acid salt of donecopirdine was synthesized using fumaric acid in iPrOH.



Scheme 1: Synthetic pathways for access to donecopirdine. Conditions and reagents: (a) CDI, THF; (b) KO2CCH2CO2Et, MgCl2, THF; (c) N-Boc 4-iodomethylpiperidine, K2CO3, DMF; (d) KOH, EtOH/H2O; (e) TFA, 1,4-dioxan or DCM; (f) 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol, K_2CO_3, 1,4-dioxane or DMF; (g) fumaric acid, iPrOH.

3.2 Donecopirdine is a potent MTDL towards AChE, 5HT$_4$R and 5HT$_6$R

In the following tests, donepezil (DPZ) was used as a reference AChE inhibitor (AChEI), idalopirdine as a selective 5-HT$_6$R ligand and RS 67333 as a reference 5-HT$_4$R ligand (Figure 1). Donecopirdine was evaluated as a potential inhibitor of human AChE, using the Ellman assay [29], as well as a potential ligand for human 5-HT$_6$R and 5-HT$_4$R using a radioligand displacement assay (Table 1).

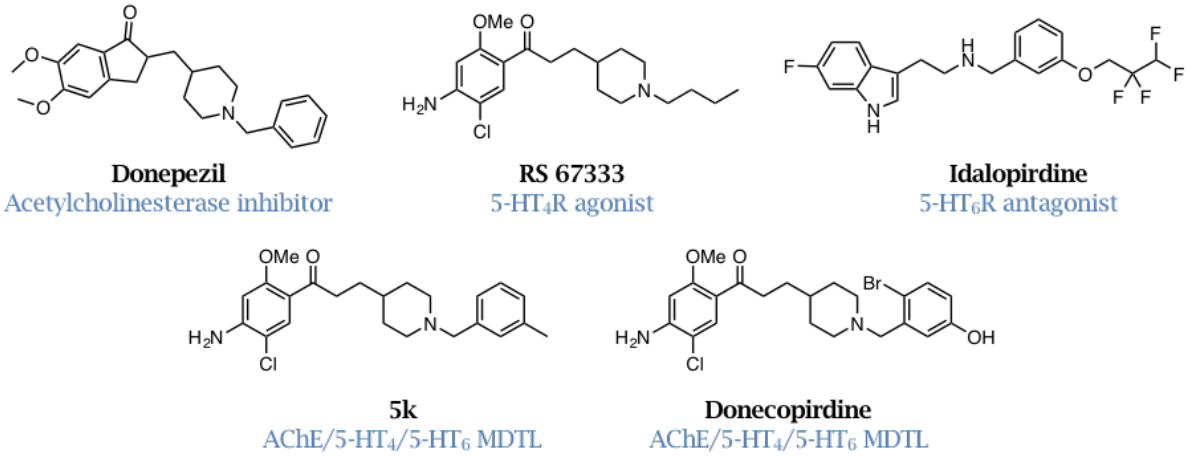


Figure 1: Structure of donepezil, RS 67333, idalopirdine and **5k**.

	(*h*)AChE	(*h*)5-HT$_6$R		(*h*)5-HT$_4$R	
	%10^{-6}M	%10^{-6}M	%10^{-8}M	%10^{-6}M	%10^{-8}M
Donepezil*	97	-	-	-	-
Idalopirdine*	-	106	88	-	-
RS 67333*	-	-	-	100	42
5k*	89	80	9	98	25
Donecopirdine	86	98	19	100	45

Table 1. (*h*)AChE inhibitory activity, (*h*)5-HT$_6$R and (*h*)5-HT$_4$R affinity for donepezil, idalopridine, RS 67333, our previously described compound **5k** and donecopirdine (% inhib at 10^{-6}M, 10^{-8}M and 10^{-8} M respectively). * Data previously reported in [28]

Donecopirdine displayed submicromolar activities towards (*h*)AChE, 5-HT$_4$R and 5-HT$_6$R (Table 2). Its activity is quite better for the two serotonergic receptors than for AChE. Nevertheless, AChE inhibitory property is acceptable since getting three activities towards three distinct targets is very challenging.

	(*h*)AChE	(*h*)5-HT$_6$R	(*h*)5-HT$_4$R
	IC$_{50}$ (nM) (n = 2)	K*i* (nM) (n = 3)	K*i* (nM) (n = 3)
Donepezil*	7 ± 1.5	ND	ND
Idalopirdine*	ND	6.9 ± 1.2	ND
RS 67333*	ND	ND	5.1± 0.5
5k*	161 ± 43	230 ± 49	168 ± 15
Donecopirdine	274 ± 8	91 ± 11	29 ± 12

Table 2. (*h*)AChE inhibitory activity (IC$_{50}$) and (*h*)5-HT$_6$R and (*h*)5-HT$_4$R affinity (K*i*) for donepezil, idalopirdine, RS 67333, our previously described compound **5k** and donecopirdine. ND, not determined.

On the basis of these results, the pharmacological profiles of donecopirdine towards 5-HT$_4$R and 5-HT$_6$R were determined in COS-7 transiently expressing one or the other receptor. SB 271046 was used as a control 5-HT$_6$R full antagonist and 5-HT as control 5-HT$_4$R full agonist. Donecopirdine acted as a partial agonist towards (*h*)5-HT$_4$R, slightly more potent than RS 67333 (Table 3 and figure 2A), and as an inverse agonist towards (*h*)5-HT$_6$R in the same way as idalopirdine (Figure 2B). As a 5-HT$_4$R partial agonist, donecopirdine should promote the non-amyloidogenic processing of APP and thus the release of sAPPα. The capacity of donecopirdine to promote sAPP secretion was evaluated on COS-7 cells expressing 5-HT$_4$R. To the same extend as RS 67333, donecopirdine dose-dependently induced the release of APP extracellular domain (Table 3 and figure 2C). Interestingly, we demonstrated that donecopirdine was able to reverse the constitutive activity of the 5-HT$_6$R, thus behaving as an inverse agonist (Figure 2D). SB 271046 and idalopirdine are also inverse agonists towards 5-HT$_6$R.

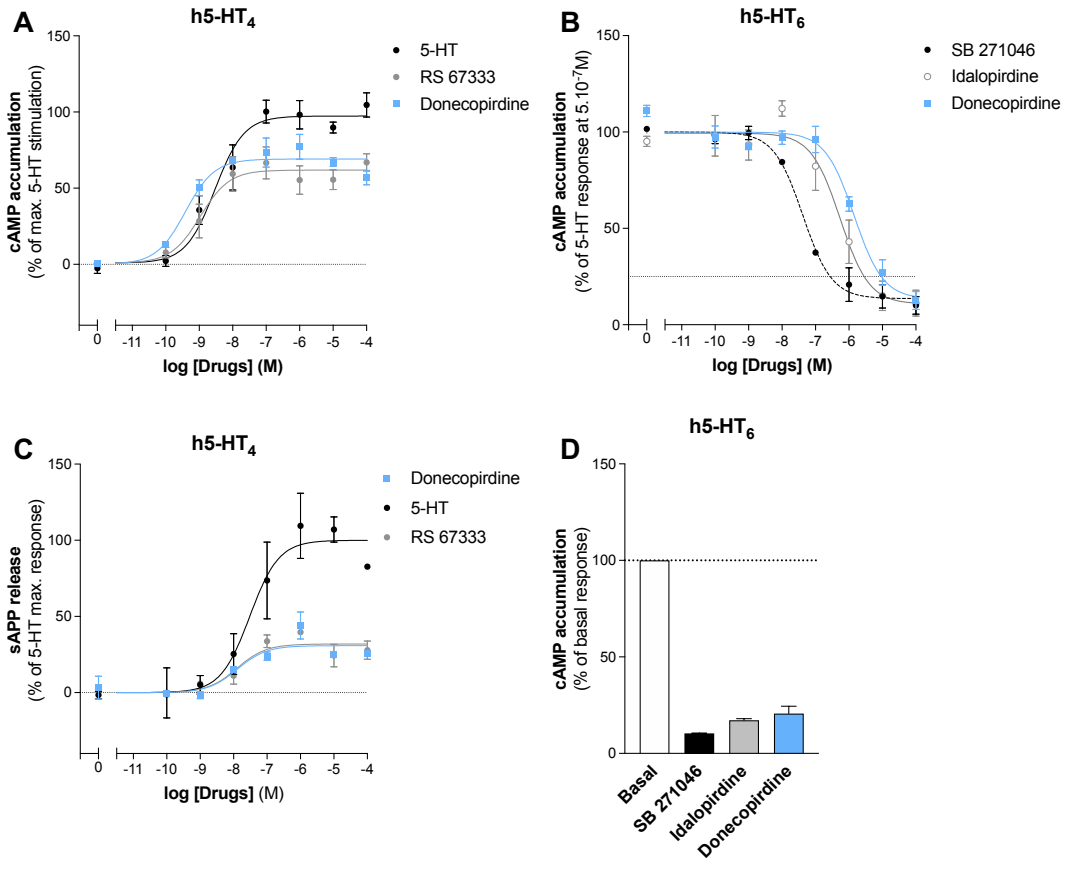


Figure 2: Pharmacological profile of donecopirdine. Experiments demonstrating partial agonist activities of RS 67333 and donecopirdine towards (*h*)5-HT$_{4(a)}$R (A) and antagonist activities of SB 271046, idalopirdine and donecopirdine towards (h)5-HT$_6$R stimulated with 5.10^{-7}M of 5-HT (B); data are means ± standard error of the mean (SEM); n = 3. (C) Representative experiment illustrating the promotion of sAPP secretion by RS 67333 and donecopirdine in COS-7 cells expressing (*h*)5-HT$_{4(a)}$R. (D) Inverse agonist activities of SB 271046, idalopirdine and donecopirdine (10^{-4}M) towards (*h*)5-HT$_6$R in absence of 5-HT (means ± SEM of two independent experiments performed in duplicates).

	(*h*)5-HT$_4$R		(*h*)5-HT$_6$R
	cAMP	sAPP	cAMP
	EC$_{50}$ (nM) (n = 3)	EC$_{50}$ (nM) (n = 3)	IC$_{50}$ (nM) (n = 3)
5-HT	6.3 ± 4.9	32.3 ± 4.4	ND
RS 67333	2.6 ± 2.1	15.4 ± 8.1	ND
SB 271046	ND	ND	41.9 ± 8.0
Idalopirdine	ND	ND	595 ± 308
Donecopirdine	0.4 ± 0.1	19.6 ± 6.5	1484 ± 282

Table 3. Functional pharmacological profile of donecopirdine. (*h*)5-HT$_4$R agonist activity (EC$_{50}$) towards cAMP production and sAPP release for 5-HT, RS 67333 and donecopirdine. *h*)5-HT$_6$R antagonist activity (IC$_{50}$) towards cAMP production for SB 271046, idalopirdine and donecopirdine. ND, not determined.

3.3 Donecopirdine presents antioxidant properties

Donecopirdine antioxidant ability was evaluated in two tests, DPPH, and ORAC [33]. The ORAC$_{Fl}$ assay was conducted in an aqueous medium according to well-described procedure. It evaluates the antioxidant activity via a Hydrogen Atom Transfert (HAT) mechanism. Calculating the AUC of the fluorescence decrease for 1.5 hours, quantitative and kinetic aspects are both taken into account. In that test, donecopirdine showed a noticeable antioxidant activity which appeared to be 3-fold more potent than Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid), a widely used antioxidant reference compound. (Table 4). The DPPH assay was performed in an organic solvent and enabled the evaluation of antioxidant activity following a Single-Electron-Transfer (SET) mechanism as described in [34]. Here, donecopirdine presented no activity.

	ORAC ($\mu M_{compound}$ / $\mu M_{Trolox®}$)	DPHH EC$_{50}$ at 60 min (nM)
Donecopirdine	2.88 ± 0.15	> 250
Quercetin	6.50 ± 0.73	xx ± xx
Trolox®	1	22.5 ± 0.9

Table 4: *In vitro* antioxidant activities of donecopirdine

3.4 Donecopirdine presents a safe toxicological profile

In Swiss male mice (8-week-old), donecopirdine (fumarate salt) showed a slight and transient hyperactivity at subtoxic doses 1-10 mg/kg and a slight and transient hypoactivity at 100 mg/kg (i.p. administration). At toxic dose, 100 mg/kg, no mortality was observed over 24 hours, which suggests that lethal dose is higher than 100 mg/kg (a weight loss of 1.2 g average has been noticed 24 hours after the injection). The spontaneous locomotor activity was not affected by the tested doses of 1, 3 and 10 mg/kg (Figure 3A).

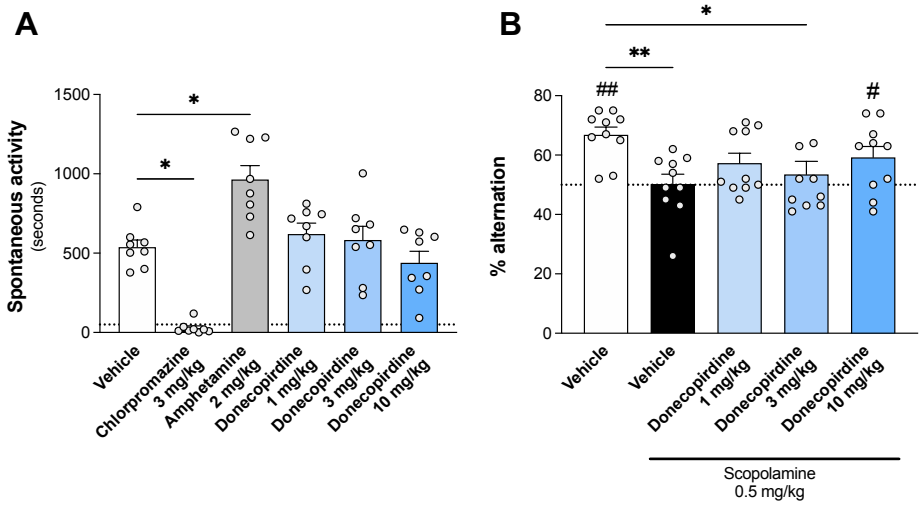


Figure 3: Effect of donecopirdine on spontaneous activity and scopolamine-induced impairment. Donecopirdine does not modify the spontaneous activity of Swiss mice (A). Chlorpromazine and amphetamine were used as controls. Data are expressed as means ± SEM (n = 8/group). *p < 0.05 vs. vehicle (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test). Effect of donecopirdine on scopolamine-induced impairment during the spontaneous alternation test. Data are expressed as means ± SEM (n = 10/group). Drugs were administered i.p. 30 min before the test, and scopolamine was administered s.c. 20 min before the test. **p < 0.01, *p < 0.05 vs. 50% (Wilcoxon test). ##p < 0.01, #p < 0.05 vs. vehicle alone (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

3.5 Donecopirdine partially counteracts the scopolamine-induced impairment

In Swiss male mice (8-week-old), donecopirdine (fumarate salt) exhibited an antiamnesic effect at 1 and 10 mg/kg in regards to scopolamine-induced spontaneous alternation deficits (Figure 3B). No significant effect was seen at the 3 mg/kg dose.

3.6 Chronic donecopirdine administration prevents cognitive deficits in 5XFAD mice

It is now well documented that administration of 5-HT_4R agonists or 5-HT_6R antagonists can improve memory and learning performance [11, 12, 21, 35-38]. Therefore, we investigated whether chronic administration of donecopirdine could also exert pro-cognitive and/or preventive effects in 5XFAD mice, a mouse model of AD. 5XFAD mice and WT littermates, both treated with vehicle, were used as control groups. 5XFAD mice treated with DPZ were included as comparison with a symptomatic treatment currently available. Each

group was injected twice a week at 1 mg/kg for 6-week-old to 6-month-old (18 weeks of treatment). Episodic-like memory of the mice was assessed at 5-month-old using the NOR (Novel Object Recognition) paradigm (Supplementary figure 1A). Of importance, these experiments were conducted using animals bred in SOPF (Specific and Opportunist Pathogen Free) animal housing. The amyloid pathology is dependent of the microbiota composition and animal housing status [39] but also of the genetic background of the mice (https://www.jax.org/strain/006554). Consequently, the appearance of memory impairment can be delayed in SOPF 5XFAD mice in comparison with conventionally bred mice (memory impairment at 4 months of age in C57BL/6SJL, [11]). In the current experiments, the cognitive deficits of SOPF 5XFAD (C57BL/6J background) were only detectable at the age of 5 months (Supplementary figure 1A), which can be considered as a "mild cognitive impairment" status for the mice.

The NOR test was performed in a V-maze [40] after 14 weeks of treatment. To evaluate the long-term recognition memory performances of the mice, an inter-trial interval of 24h was applied between two exploration trials of 5 min. In this paradigm, the 5XFAD mice were unable to discriminate between familiar and novel object (Figure 4A-B). The transgenic mice that received donecopirdine presented memory performances similar to WT mice treated with vehicle (Figure 4A-B) with a discrimination index that is close to significance ($p = 0.052$). However, in the same conditions, donepezil was unable to prevent the cognitive impairment of the 5XFAD mice. Mice treated with donepezil and donecopirdine presented a decrease in the total exploration time in comparison with WT mice (Figure 4C). Nevertheless, their exploratory ability was not different from the total exploration time of the 5XFAD treated with vehicle. As a result, donecopirdine showed superior potential than donepezil to preserve episodic-like memory in the NOR test.

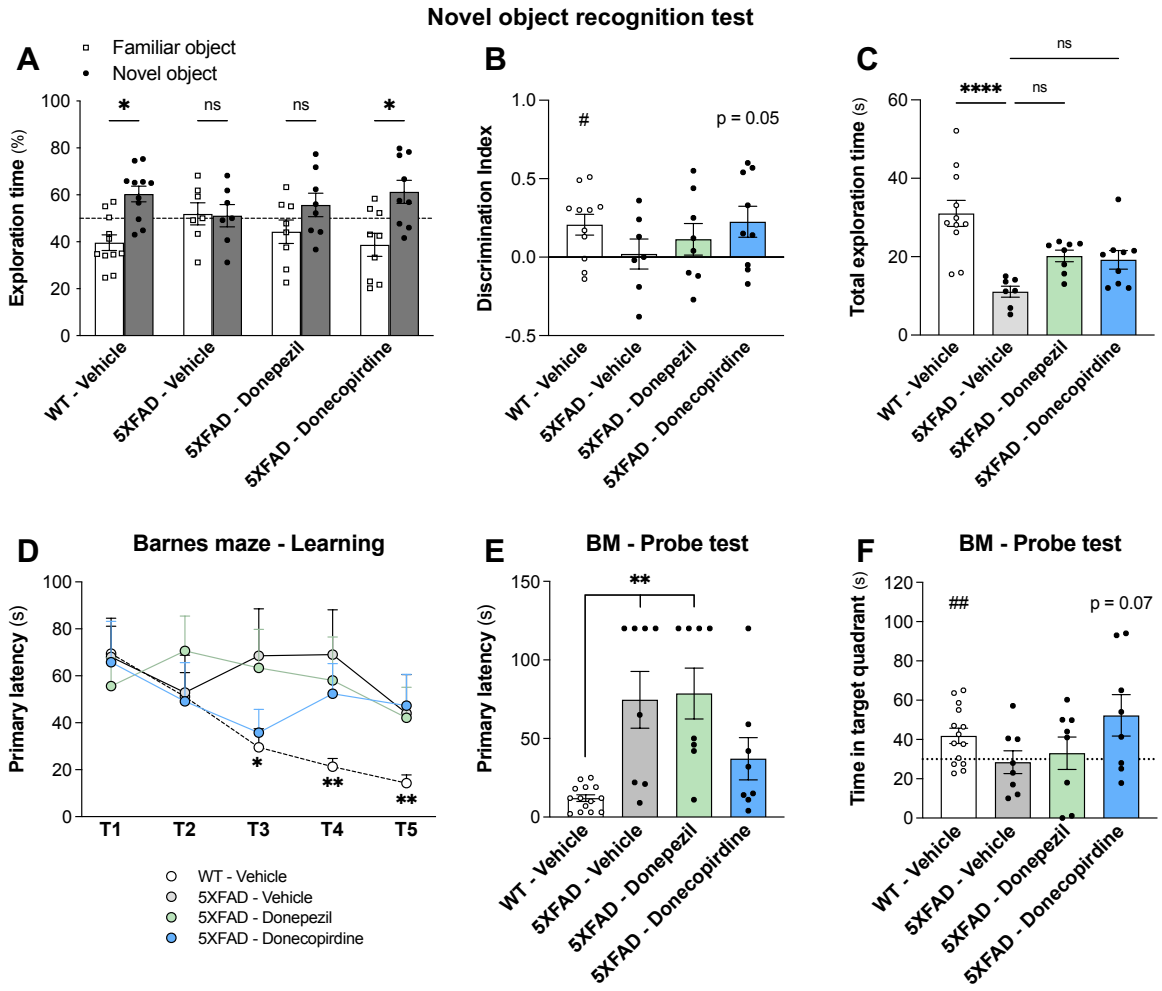


Figure 4. Effects of test items on recognition memory, learning capacities and long-term memory. Six-week-old 5XFAD females and WT littermates were treated with donecopirdine, donepezil (1 mg/kg) or vehicle, twice a week for 14 and 18 weeks before NOR and Barnes maze (BM) tests, respectively. **(A-C)** NOR test with 5-min exploration sessions and a 24-hr intersession interval. **(A)** Time spent by mice exploring familiar and novel objects during test session. *p < 0.05, significantly different from familiar object (two-way repeated-measures ANOVA with object and treatment as factors, followed by Bonferroni's test). **(B)** Discrimination index calculated by using exploration times in test session and formula [(novel − familiar)/(familiar + novel)]. Indices different from zero: #p < 0.05, significantly different from zero (one sample Student's *t* test). **(C)** Total exploration time in test session ***p < 0.0001, significantly different from 5XFAD-vehicle group (One-way ANOVA followed by Bonferroni's test). **(D-F)** Barnes maze test with 5 training trials and 48h-probe test. **(D)** Learning curves representing the primary latency to target during the 5 training days. **p < 0.01, *p < 0.05 vs. T1 trial (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test). **(E-F)** Probe trial performance 48 h after the last training session. **(E)** Primary Latency to target **p < 0.01 vs. WT treated with vehicle (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test). **(F)** Time spent in target quadrant. ##p < 0.05 different from chance level indicated with a dashed line (unpaired Student's *t* test). Data are the mean ± SEM (n = 7-9 mice/group for 5XFAD, n = 11-14 for WT); each dot corresponds to a mouse in A-C and E-F.

Two days after the last administration of the drugs (T18, Scheme 2), Barnes maze experiment was performed to assess for learning and memory performances of the mice. We used a shortened protocol developed by Attal *et al.* that was proven efficient in a mouse model of AD [41]. After 5 training sessions, 5XFAD mice demonstrated clear impairment in learning compared to WT mice, with a primacy latency to target of 42-47 seconds in average for 5XFAD mice and 14 seconds for WT mice (Figure 4C). WT-vehicle treated mice presented significant

decrease of primary latency at trials T3, T4 and T5 (two-way repeated-measure ANOVA with Geisser-Greenhouse correction, treatment and trial as factors, followed by Bonferroni's test; $p = 0.0313$, $p = 0.0081$ and $p = 0.0028$, respectively vs. T1). Donecopirdine-treated animals presented a learning slope similar to the WT mice during the 3 first training sessions. Moreover, donecopirdine was capable to partially prevent the memory deficits of 5XFAD mice, as attested by a slower primary latency to target (Figure 5D) and more occupancy of the target quadrant (Figure 5E) in the probe test. Conversely, donepezil was unable to prevent learning and memory impairment in this paradigm, as donepezil-treated mice presented cognitive deficits similar to the 5XFAD control mice (Figure 4C-E).

3.7 Chronic donecopirdine administration reduces amyloid pathology and astrogliosis in 5XFAD mice

Amyloid load in the brains of the 5XFAD mice showed a significant decrease in compact amyloid plaques in the entorhinal cortex of donecopirdine-treated animals compared with mice that received the vehicle (Figure 5A and supplementary figure 2A). No significant effect was detected with donepezil treatment. Quantification of human Aβ species in brain extracts confirmed a reduction of $A\beta_{42}$ levels and a downward trend of $A\beta_{40}$ peptides in insoluble fractions from donecopirdine group (Figure 5B, C). Quantification of human $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ peptides in donepezil-treated group showed also a decreasing trend, which did not reach significance. No significant effect was detected in the soluble fractions, whatever the treatment or the APP-derived species investigated (human amyloid peptides and soluble fragments sAPPα and $sAPP\beta_{Swe}$) (Supplementary figure 2B, C). Interestingly, the analysis of murine amyloid peptides showed higher $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ levels in 5XFAD mice compared to WT littermates, adaptative resultant of the overexpression of human mutated APP in the transgenic mice (Figure 5D, E). The level of murine Aβ peptides in mice treated with donecopirdine and donepezil was not significantly different from vehicle-treated 5XFAD group.

Astrogliosis and microgliosis were evaluated using immunoblotting of GFAP and Iba1, respectively, in brain homogenates from WT and 5XFAD mice. As expected, our analyses revealed a huge increase of the neuroinflammation in 5XFAD mice in comparison to WT littermates, with significant increase of GFAP (Figure 5F) and Iba1 markers (Supplementary figure 2D). Donecopirdine, but not donepezil, was able to reduce the level of GFAP (Figure 5F). The two molecules had no significant effect on Iba1 quantity in the brain extracts.

Collectively, these results show that donecopirdine chronic treatments reduced amyloidosis and astrogliosis in 5XFAD mice, whereas in the same paradigm, donepezil was unable to achieve such effects.

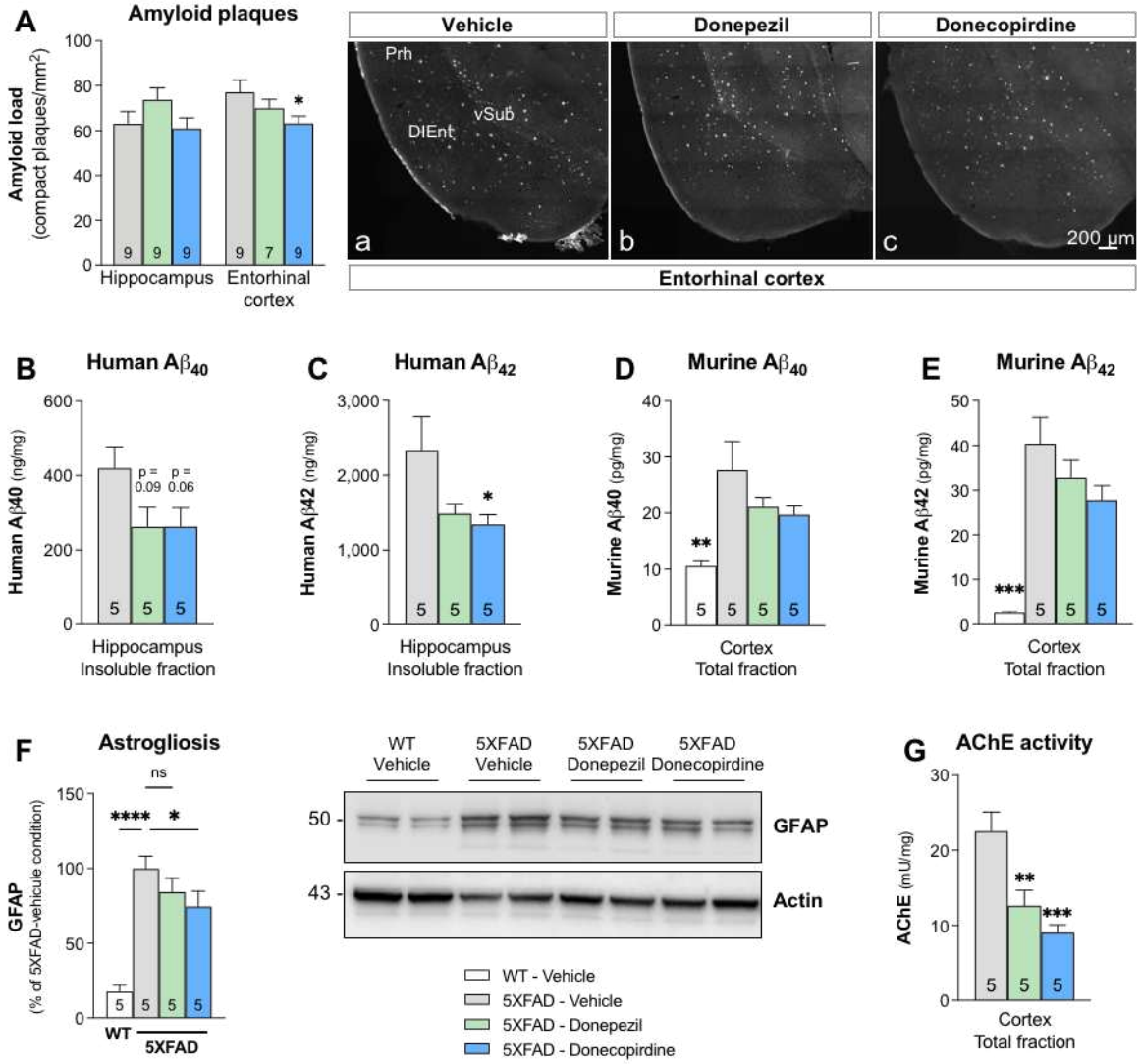


Figure 5. Effects of test items after 18 weeks of chronic treatment in 5XFAD mice. Six-week-old 5XFAD females and WT littermates were treated twice a week with donecopirdine, donepezil (1 mg/kg) or vehicle. **(A)** Quantification of amyloid plaque load (number of plaques/mm^2, Thioflavin T staining) and representative epifluorescence microphotographs of thioflavin T staining in the entorhinal cortex (a-c) from 5XFAD mice. *p < 0.05, significantly different from 5XFAD-vehicle group (two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test). **(B-E)** Quantification of amyloid load in mouse brain extracts: human Aβ_{40} **(B)** and Aβ_{42} **(C)** in insoluble hippocampal fractions; murine Aβ_{40} **(D)** and Aβ_{42} **(E)** in cortical total fraction. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, vs. 5XFAD-vehicle (Kruskal-Wallis pairwise test) **(F)** Immunoblot analysis of GFAP in cortical homogenates and densitometric analysis of immunoblots (normalized by the amount of actin), with the levels in the 5XFAD-vehicle group set as 100%. (**G**) AChE activity assessed in cortical homogenates. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, vs. 5XFAD-vehicle (One-way ANOVA followed by Fisher's LSD test). All results are expressed as mean ± SEM, sample size is indicated within the bars. Scale bar: 200 µm. PRh: Perirhinal cortex; DIEnt: dorsal intermediate entorhinal field; vSub, ventral subiculum.

3.8 Chronic donecopirdine administration reduces AChE activity in 5XFAD mice

Donecopirdine was conceived to exert, as donepezil, a symptomatic effect *via* the blockade of AChE activity. After 18 weeks of chronic administration with donepezil and donecopirdine, comparative enzymatic activity of AChE was assessed on brain extracts from 5XFAD mice. We found a clear reduction of the AChE activity in brains of donepezil treated mice (Figure 5G). Surprisingly, the reduction of this enzymatic activity was even more pronounced for donecopirdine-treated mice, despite i*n vitro* evaluations showing a weaker inhibitory property for donecopirdine compared to donepezil. These results demonstrated that AChE was acceptably engaged by donecopirdine in our chronic preventive paradigm.

3.9 Chronic administration of drugs induces changes in the intestinal microbiota

Microorganisms (bacteria, viruses, parasites and fungi) in the intestine are major players in human health and influence brain functions [42]. The composition of the gut microbiota or microbial signature is important in controlling mood, food intake, cognition and memory [43-45]. The intestinal microbiota appears to be modulated during aging and in neurological pathologies. In humans, the characterization of the intestinal microbiota reveals dysbiosis in Alzheimer's patients versus healthy controls [46-49]. Different microbial compositions are also observed in experimental animal models of AD vs. WT littermates [39, 50-52]. To perform a complete evaluation of the drugs, including their impact on the microbiome, we analyzed the bacterial composition of the fecal microbiota in drug and vehicle-treated mice using 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing.

Considering the alpha diversity, no major difference in bacterial richness or evenness was detected between SOPF WT and 5XFAD mice treated with vehicle (Figure 6A). An increasing trend in alpha diversity was shown in pairwise analysis (Supplementary figure 3A), that is in opposition with the decreasing trend observed in conventional housing (Supplementary figure 4A). The beta diversity analysis of SOPF WT and 5XFAD confirmed no major divergence between the two groups (Supplementary figure 4B), in opposition to a clear separation of WT and 5XFAD groups in conventional housing (Supplementary figure 3B). Relative abundance of taxa at phylum, genus or species (Supplementary figures 4C-E) confirmed few discriminant features between SOPF WT and 5XFAD mice at 6 months of age. Statistical analysis revealed, at the genus level, an increase of *Lachnospiraceae UCG-006* and, at the species level, an increase of *Clostridiales bacterium CIEAF 026* and the same trend for *C. bacterium CIEAF 021* (Supplementary figures 4E, F). On the contrary in conventional housing, the microbiota composition of WT and 5XFAD is extremely divergent, as attested by

the relative abundance of taxa at phylum, genus or species and the statistical pairwise comparison using LefSe analysis (Supplementary figures 3C-E). Collectively, these results showed that at 6-month-old in SOPF housing, the bacterial dysbiosis of 5XFAD is not installed, in contrary to what happened in our conventional housing and to the dysbiosis reported by other groups at 9-month-old [53].

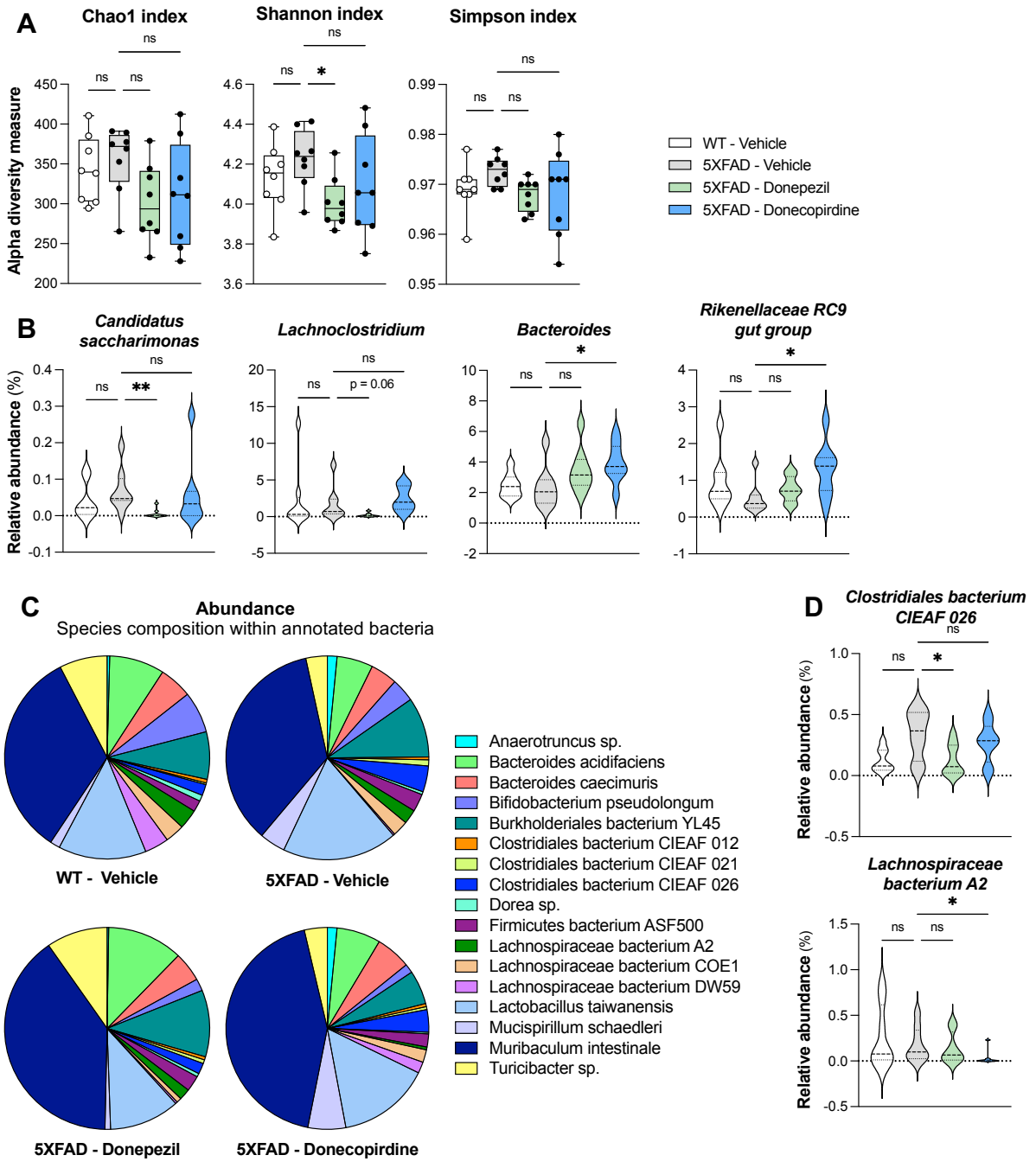


Figure 6. Effects of donepezil and donecopirdine on fecal microbiota composition after 18 weeks of chronic treatment in 5XFAD mice. (A) Alpha diversity as measured by Chao1's, Shannon's and Simpson's indexes. Data are presented as min to max, featuring means, each dot represents a mouse. **(B-D)** relative abundance of taxa. Relative abundance of modulated taxa at the genus level **(B)** or at the species level **(D)**. Only the species with abundance ≥ 0,04% have been considered. Data (n = 8) are presented as violin plots featuring frequency distribution of data, median (dashed line) and quartiles (dotted line). (**C**) Synthetic diagram presenting relative abundance of species composition within annotated bacteria. *p < 0.05 (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test).

Donepezil treatment induced a significant decrease of alpha diversity at the operational taxonomy units (OTU) in comparison with 5XFAD mice treated with vehicle, as shown by the Shannon index, which is more sensitive to the richness and evenness of the samples (Figure 6A). This effect is also detected in pairwise comparisons by the Simpson index (more sensitive to the evenness) (Supplementary figure 5A). No major impact of donecopirdine treatment was visible on bacterial richness or evenness ((Figure 6A and Supplementary figure 6A). Beta diversity analysis of the two treatments revealed dissimilarities induced by the drugs: for donepezil the diversity and the dispersion are statistically different vs. 5XFAD-vehicle group (PERMANOVA, $p = 0.02$ and PERMDISP, $p = 0.04$, using unifrac index); for donecopirdine the diversity and dispersion are close to significance (PERMANOVA, $p = 0.06$, using jaccard index and PERMDISP, $p = 0.07$, using unifrac index). Comparing the 4 groups of mice, donepezil induced a significant decrease of the *Canditatus saccharimonas* genus and of the *Clostridiales bacterium CIEAF 026* species. A decreasing trend of the *Lachnoclostrium* genus was also observed in donepezil-treated group (Figure 6B-D). Donecopirdine treatment resulted in a significant increase in two genera, *Bacteroides* and *Rikenellaceae RC9 gut group,* and a reduction in the abundance of the *Lachnospiraceae bacterium A2* species (Figure 6B-D). Pairwise comparisons of drug-treated groups with 5XFAD-vehicle group (Supplementary figures 5C-E and 6C-E) using the LEfSe analysis, revealed a divergence in fecal microbiota composition of 3 genera and 5 species for donepezil treatment (Supplementary figures 5F,G) and of one phylum, 4 genera and one species for donecopirdine treatment (Supplementary figures 6F,G).

Collectively, these results demonstrated that donepezil and donecopirdine differentially impact gut microbiota composition after chronic treatment in 5XFAD mice. The complementary metabolomic analysis of fecal and blood sample will provide insights to mechanically comprehend the interplay between drugs and bacteria.

3.10 Ten-day administration of donecopirdine has a curative effect in 5XFAD mice

Our first set of data aimed to evaluate the preventive potential of donecopirdine in 5XFAD mice. However, as the diagnosis of AD is often made after the appearance of cognitive deficits, we conducted a second analysis using a subchronic protocol (Supplementary figure 1B). 5-month-old 5XFAD mice have been treated twice a day during ten consecutive days with vehicle or 1.5 mg/kg of donepezil or donecopirdine. Long-term recognition memory performances of the mice, was assessed using the NOR test in a rectangular arena and the same inter-trial interval of 24h between two exploration trials of 5 min used previously. In this

paradigm, the 5XFAD mice were unable to discriminate between familiar and novel object (Figure 7A-B). The donecopirdine-treated group presented memory performances similar to WT mice treated with vehicle (Figure 7A-B) with a significant discrimination index. However, in the same conditions, donepezil was unable to prevent the cognitive impairment of the 5XFAD mice. Mice treated with donepezil and donecopirdine presented a decrease in the total exploration time in comparison with WT mice (Figure 7C). Nevertheless, their exploratory ability was not different from the total exploration time of the 5XFAD treated with vehicle. As a result, donecopirdine demonstrated its ability to restore episodic-like memory in the NOR test, while donepezil was unable to be effective in this "curative" treatment paradigm.

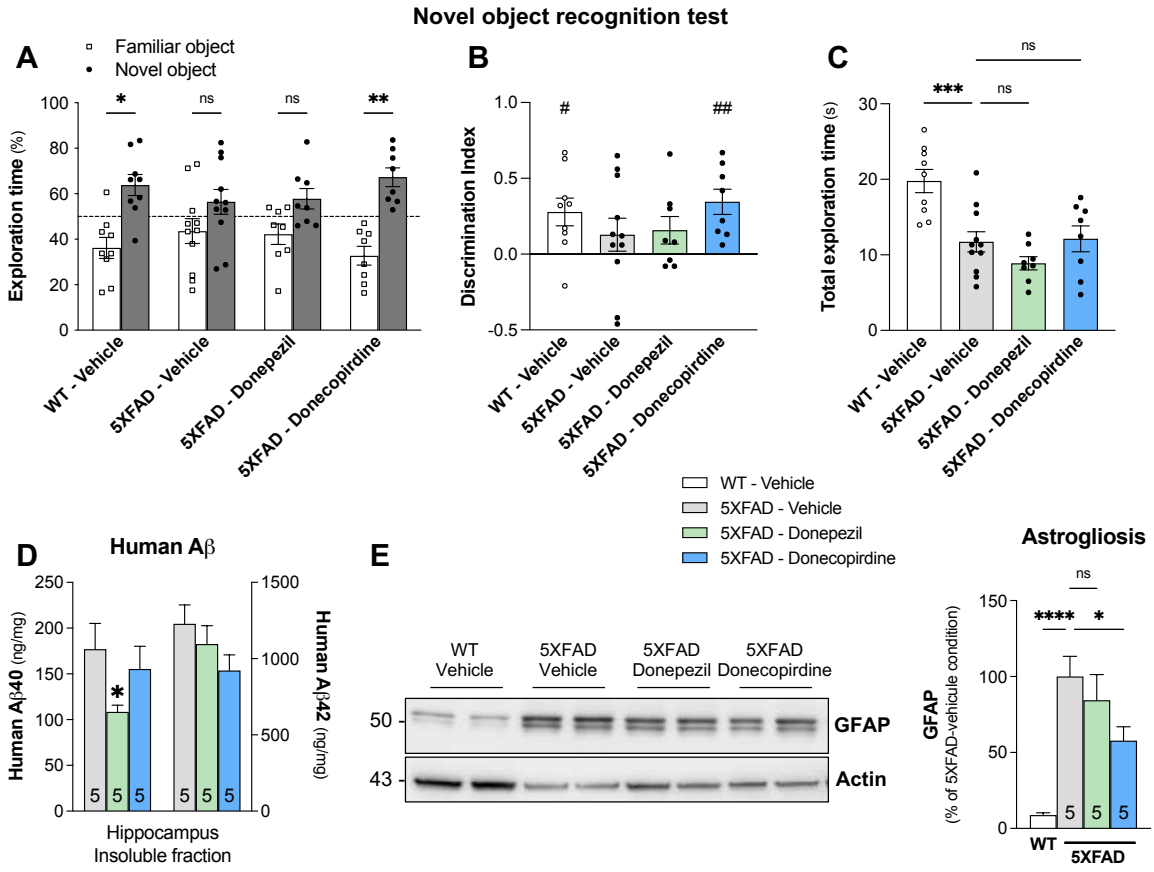


Figure 7. Effects of test items on recognition memory of 5-month-old 5XFAD mice. 5XFAD females and WT littermates were treated with donecopirdine, donepezil (1.5 mg/kg) or vehicle, twice daily for 10 days before NOR test. **(A-C)** NOR test with 5-min exploration sessions and a 24-hr intersession interval. **(A)** Time spent by mice exploring familiar and novel objects during test session. *p < 0.05, **p < 0.01, significantly different from familiar object (two-way repeated-measures ANOVA with object and treatment as factors, followed by Bonferroni's test). **(B)** Discrimination index. Indices different from zero: #p < 0.05, ##p < 0.01, significantly different from zero (one sample Student's *t* test). **(C)** Total exploration time in test session ***p < 0.001, significantly different from 5XFAD-vehicle group (One-way ANOVA followed by Bonferroni's test). Data are the mean ± SEM (n = 8-11 mice/group for 5XFAD, n = 8 for WT); each dot corresponds to a mouse in A-C. **(D)** Quantification human $A\beta_{40}$ (left Y-axis) and $A\beta_{42}$ (right Y-axis) in mouse brain extracts in insoluble hippocampal fractions. **(E)** Immunoblot analysis of GFAP in cortical homogenates and densitometric analysis of immunoblots (normalized by the amount of actin), with the levels in the 5XFAD-vehicle group set as 100%. ***p < 0.001, *p < 0.05, vs. 5XFAD-vehicle (One-way ANOVA followed by Fisher's LSD test). All results are expressed as mean ± SEM, sample size is indicated within the bars.

Unexpectedly, donepezil treatment reduced $A\beta_{40}$ level in hippocampal insoluble fraction, whereas donecopirdine showed no significant effect on amyloid load (figure 7A and Supplementary figure 7A, B). The 10-day-treatments had no impact on APP-derived soluble fragments (Supplementary figure 7C, D). However, analysis of astrogliosis demonstrated that donecopirdine was able to reduce the neuroinflammation in the 5XFAD mice whereas donepezil had no significant effect on GFAP level (Figure 7 E).

To conclude, these results demonstrated that donecopirdine, a triple activity molecule, present interesting therapeutic potential in preclinical models of AD. Administration of the drug to 5XFAD mice was able to prevent the appearance of cognitive impairments but also to revert memory deficit at the beginning of their manifestation. In the tested paradigms, donepezil was inefficient. Donecopirdine action is associated with microbiome and metabolome modulations.

This article will be further completed by on-going analysis assessing the following items:

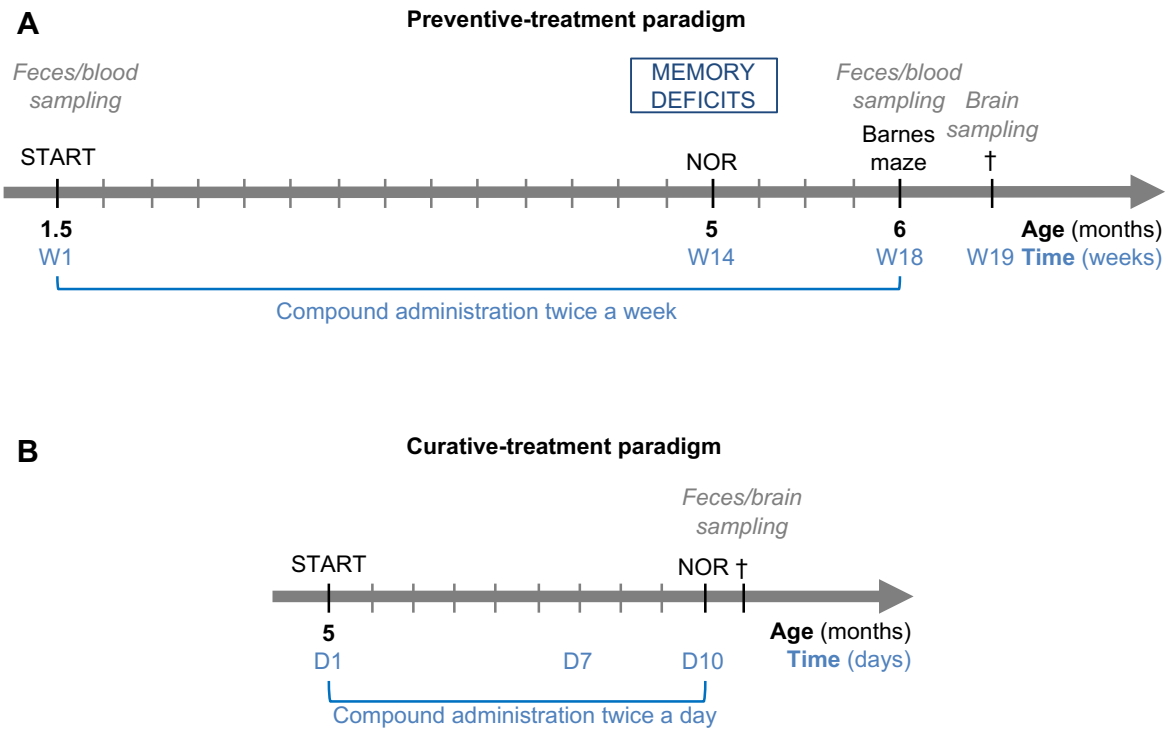
- Complementary analysis of metabolome
- Preliminary analysis of microbiome modulation upon subchronic treatments

4. References

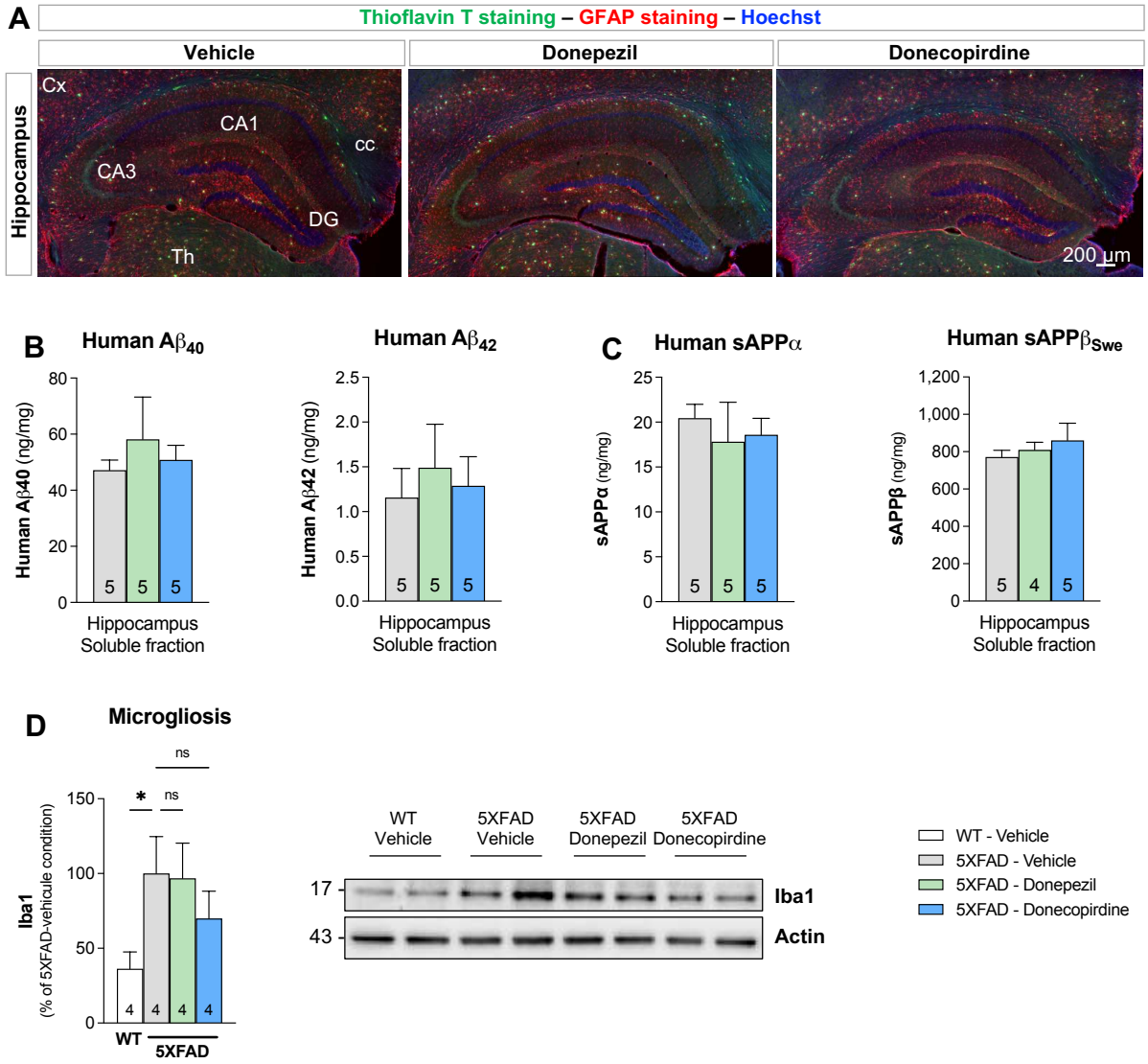
1. Andrieu, S., Coley, N., Lovestone, S., Aisen, P. S. & Vellas, B. (2015) Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions, *Lancet Neurol.* **14**, 926-944.
2. Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M. & Zhong, K. (2019) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019, *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions 5*, 272-293.
3. Cummings, J., Lee, G., Mortsdorf, T., Ritter, A. & Zhong, K. (2017) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017, *Alzheimers Dement (N Y).* **3**, 367-384.
4. Cummings, J., Aisen, P. S., DuBois, B., Frolich, L., Jack, C. R., Jr., Jones, R. W., Morris, J. C., Raskin, J., Dowsett, S. A. & Scheltens, P. (2016) Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025, *Alzheimers Res Ther.* **8**, 39.
5. de Freitas Silva, M., Dias, K. S. T., Gontijo, V. S., Ortiz, C. J. C. & Viegas, C., Jr. (2018) Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer's Disease: An Update, *Curr Med Chem.* **25**, 3491-3525.
6. Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D. & Malawska, B. (2015) Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease, *Curr Med Chem.* **22**, 373-404.
7. Wang, T., Liu, X. H., Guan, J., Ge, S., Wu, M. B., Lin, J. P. & Yang, L. R. (2019) Advancement of multi-target drug discoveries and promising applications in the field of Alzheimer's disease, *Eur J Med Chem.* **169**, 200-223.
8. Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., Bouet, V., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert Freon, A., Mignani, S., Cresteil, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2014) Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, E3825-30.
9. Rochais, C., Lecoutey, C., Gaven, F., Giannoni, P., Hamidouche, K., Hedou, D., Dubost, E., Genest, D., Yahiaoui, S., Freret, T., Bouet, V., Dauphin, F., Sopkova de Oliveira Santos, J., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert-Freon, A., Legay, R., Boulouard, M., Claeysen, S. & Dallemagne, P. (2015) Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride, *J Med Chem.* **58**, 3172-87.
10. Yahiaoui, S., Hamidouche, K., Ballandonne, C., Davis, A., de Oliveira Santos, J. S., Freret, T., Boulouard, M., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2016) Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) partial agonist and 5-HT6R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease, *Eur J Med Chem.* **121**, 283-293.
11. Giannoni, P., Gaven, F., de Bundel, D., Baranger, K., Marchetti-Gauthier, E., Roman, F. S., Valjent, E., Marin, P., Bockaert, J., Rivera, S. & Claeysen, S. (2013) Early administration of RS 67333, a specific 5-HT4 receptor agonist, prevents amyloidogenesis and behavioral deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Front Aging Neurosci.* **5**, 96.
12. Baranger, K., Giannoni, P., Girard, S. D., Girot, S., Gaven, F., Stephan, D., Migliorati, M., Khrestchatisky, M., Bockaert, J., Marchetti-Gauthier, E., Rivera, S., Claeysen, S. & Roman, F. S. (2017) Chronic treatments with a 5-HT4 receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Neuropharmacology.* **126**, 128-141.
13. Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J. L., Fischmeister, R. & Lezoualc'h, F. (2003) Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha, *Nat Cell Biol.* **5**, 633-9.
14. Cho, S. & Hu, Y. (2007) Activation of 5-HT4 receptors inhibits secretion of beta-amyloid peptides and increases neuronal survival, *Exp Neurol.* **203**, 274-8.
15. Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., Dumuis, A. & Claeysen, S. (2013) 5-HT(4) Receptors Constitutively Promote the Non-Amyloidogenic Pathway of APP Cleavage and Interact with ADAM10, *ACS chemical neuroscience.* **4**, 130-40.
16. Upton, N., Chuang, T. T., Hunter, A. J. & Virley, D. J. (2008) 5-HT6 receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease, *Neurotherapeutics.* **5**, 458-69.
17. Claeysen, S., Bockaert, J. & Giannoni, P. (2015) Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease?, *ACS chemical neuroscience.* **6**, 940-3.
18. Khoury, R., Grysman, N., Gold, J., Patel, K. & Grossberg, G. T. (2018) The role of 5 HT6-receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update, *Expert Opin Investig Drugs.* **27**, 523-533.
19. Hirst, W. D., Stean, T. O., Rogers, D. C., Sunter, D., Pugh, P., Moss, S. F., Bromidge, S. M., Riley, G., Smith, D. R., Bartlett, S., Heidbreder, C. A., Atkins, A. R., Lacroix, L. P., Dawson, L. A., Foley, A. G., Regan, C. M. & Upton, N. (2006) SB-399885 is a potent, selective 5-HT6 receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models, *Eur J Pharmacol.* **553**, 109-19.

20. Da Silva Costa-Aze, V., Quiedeville, A., Boulouard, M. & Dauphin, F. (2012) 5-HT6 receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice, *Psychopharmacology (Berl).* **222**, 99-115.
21. de Bruin, N. M., Prickaerts, J., van Loevezijn, A., Venhorst, J., de Groote, L., Houba, P., Reneerkens, O., Akkerman, S. & Kruse, C. G. (2011) Two novel 5-HT6 receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats, *Neurobiol Learn Mem.* **96**, 392-402.
22. de Bruin, N. M. & Kruse, C. G. (2015) 5-HT6 Receptor Antagonists: Potential Efficacy for the Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia, *Curr Pharm Des.* **21**, 3739-59.
23. Marcos, B., Gil-Bea, F. J., Hirst, W. D., Garcia-Alloza, M. & Ramirez, M. J. (2006) Lack of localization of 5-HT6 receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT6 receptor-mediated acetylcholine release, *Eur J Neurosci.* **24**, 1299-306.
24. Riemer, C., Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J. R., Poli, S., Porter, R. H. & Bos, M. (2003) Influence of the 5-HT6 receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT6 receptor antagonist, *J Med Chem.* **46**, 1273-6.
25. Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. & Li, P. (2000) In vivo effects of the 5-HT(6) antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate, *Br J Pharmacol.* **130**, 23-6.
26. Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. & Li, P. (2001) The 5-HT(6) receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus, *Neuropsychopharmacology.* **25**, 662-8.
27. Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D. J., Dekeyne, A., Seveno, M., Rivet, J. M., Gaven, F., Deleris, P., Herve, D., Fone, K. C., Bockaert, J., Millan, M. J. & Marin, P. (2012) 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia, *EMBO Mol Med.* **4**, 1043-56.
28. Hatat, B., Yahiaoui, S., Lecoutey, C., Davis, A., Freret, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C. & 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 Interest Against Alzheimer's Disease, *Frontiers in Aging Neuroscience.* **11**.
29. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. & Feather-Stone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol.* **7**, 88-95.
30. Freret, T., Bouet, V., Quiedeville, A., Nee, G., Dallemagne, P., Rochais, C. & Boulouard, M. (2012) Synergistic effect of acetylcholinesterase inhibition (donepezil) and 5-HT(4) receptor activation (RS67333) on object recognition in mice, *Behav Brain Res.* **230**, 304-8.
31. Bevins, R. A. & Besheer, J. (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory', *Nat Protoc.* **1**, 1306-11.
32. Besnard, P., Christensen, J. E., Brignot, H., Bernard, A., Passilly-Degrace, P., Nicklaus, S., Pais de Barros, J. P., Collet, X., Lelouvier, B., Servant, F., Blasco-Baque, V., Verges, B., Lagrost, L., Feron, G. & Burcelin, R. (2018) Obese Subjects With Specific Gustatory Papillae Microbiota and Salivary Cues Display an Impairment to Sense Lipids, *Sci Rep.* **8**, 6742.
33. Gunesch, S., Schramm, S. & Decker, M. (2017) Natural antioxidants in hybrids for the treatment of neurodegenerative diseases: a successful strategy?, *Future Med Chem.* **9**, 711-713.
34. Lanthier, C., Payan, H., Liparulo, I., Hatat, B., Lecoutey, C., Since, M., Davis, A., Bergamini, C., Claeysen, S., Dallemagne, P., Bolognesi, M. & Rochais, C. (2019) Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT4 receptors with in cellulo antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, In press.
35. Quiedeville, A., Boulouard, M., Hamidouche, K., Da Silva Costa-Aze, V., Nee, G., Rochais, C., Dallemagne, P., Fabis, F., Freret, T. & Bouet, V. (2015) Chronic activation of 5-HT4 receptors or blockade of 5-HT6 receptors improve memory performances, *Behav Brain Res.* **293**, 10-7.
36. Mohler, E. G., Baker, P. M., Gannon, K. S., Jones, S. S., Shacham, S., Sweeney, J. A. & Ragozzino, M. E. (2012) The effects of PRX-07034, a novel 5-HT6 antagonist, on cognitive flexibility and working memory in rats, *Psychopharmacology (Berl).* **220**, 687-96.
37. Galimberti, D. & Scarpini, E. (2015) Idalopirdine as a treatment for Alzheimer's disease, *Expert Opin Investig Drugs.* **24**, 981-7.
38. King, M. V., Marsden, C. A. & Fone, K. C. (2008) A role for the 5-HT(1A), 5-HT4 and 5-HT6 receptors in learning and memory, *Trends Pharmacol Sci.* **29**, 482-92.

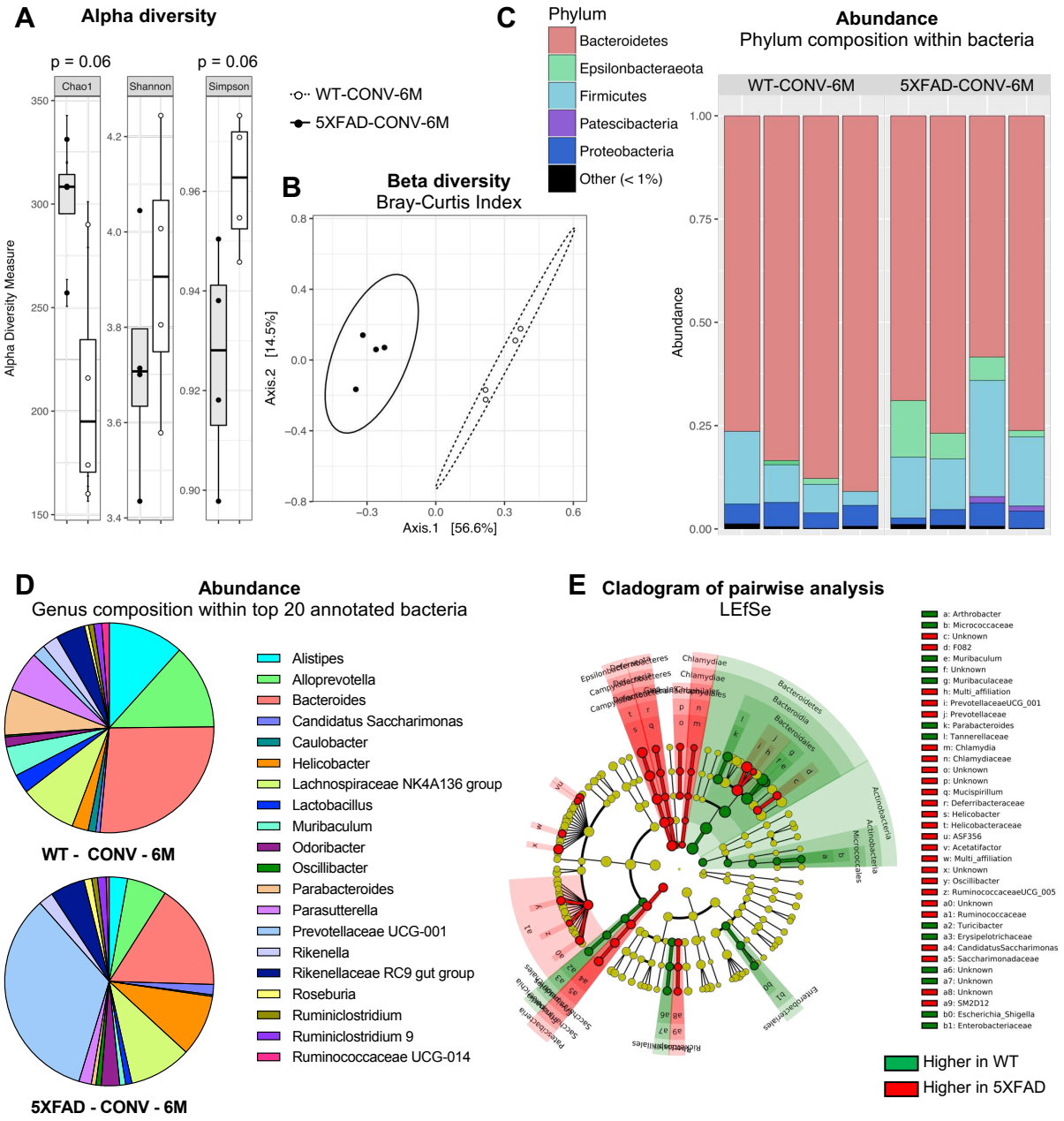
39. Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K. D., Frisoni, G., Neher, J. J., Fak, F., Jucker, M., Lasser, T. & Bolmont, T. (2017) Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota, *Sci Rep.* **7**, 41802.
40. Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Gomis-Gonzalez, M., Marsicano, G., Maldonado, R. & Ozaita, A. (2013) Dissociation of the pharmacological effects of THC by mTOR blockade, *Neuropsychopharmacology.* **38**, 1334-43.
41. Attar, A., Liu, T., Chan, W. T., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K. & Bitan, G. (2013) A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *PLoS One.* **8**, e80355.
42. Butler, M. I., Cryan, J. F. & Dinan, T. G. (2019) Man and the Microbiome: A New Theory of Everything?, *Annu Rev Clin Psychol.* **15**, 371-398.
43. Margolis, K. G., Cryan, J. F. & Mayer, E. A. (2021) The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood, *Gastroenterology.* **160**, 1486-1501.
44. Fetissov, S. O. (2017) Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour, *Nat Rev Endocrinol.* **13**, 11-25.
45. Beilharz, J. E., Kaakoush, N. O., Maniam, J. & Morris, M. J. (2018) Cafeteria diet and probiotic therapy: cross talk among memory, neuroplasticity, serotonin receptors and gut microbiota in the rat, *Mol Psychiatry.* **23**, 351-361.
46. Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B. B. & Rey, F. E. (2017) Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease, *Sci Rep.* **7**, 13537.
47. Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prelle, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., Bellandi, D., Gentile, S., Belotti, G., Villani, D., Harach, T., Bolmont, T., Padovani, A., Boccardi, M., Frisoni, G. B. & Group, I.-F. (2017) Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly, *Neurobiol Aging.* **49**, 60-68.
48. Haran, J. P., Bhattarai, S. K., Foley, S. E., Dutta, P., Ward, D. V., Bucci, V. & McCormick, B. A. (2019) Alzheimer's Disease Microbiome Is Associated with Dysregulation of the Anti-Inflammatory P-Glycoprotein Pathway, *mBio.* **10**.
49. Guo, M., Peng, J., Huang, X., Xiao, L., Huang, F. & Zuo, Z. (2021) Gut Microbiome Features of Chinese Patients Newly Diagnosed with Alzheimer's Disease or Mild Cognitive Impairment, *J Alzheimers Dis.* **80**, 299-310.
50. Dodiya, H. B., Kuntz, T., Shaik, S. M., Baufeld, C., Leibowitz, J., Zhang, X., Gottel, N., Zhang, X., Butovsky, O., Gilbert, J. A. & Sisodia, S. S. (2019) Sex-specific effects of microbiome perturbations on cerebral Abeta amyloidosis and microglia phenotypes, *J Exp Med.* **216**, 1542-1560.
51. Brandscheid, C., Schuck, F., Reinhardt, S., Schafer, K. H., Pietrzik, C. U., Grimm, M., Hartmann, T., Schwiertz, A. & Endres, K. (2017) Altered Gut Microbiome Composition and Tryptic Activity of the 5xFAD Alzheimer's Mouse Model, *J Alzheimers Dis.* **56**, 775-788.
52. Cuervo-Zanatta, D., Garcia-Mena, J. & Perez-Cruz, C. (2021) Gut Microbiota Alterations and Cognitive Impairment Are Sexually Dissociated in a Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease, *J Alzheimers Dis.* **82**, S195-S214.
53. Kim, N., Jeon, S. H., Ju, I. G., Gee, M. S., Do, J., Oh, M. S. & Lee, J. K. (2021) Transplantation of gut microbiota derived from Alzheimer's disease mouse model impairs memory function and neurogenesis in C57BL/6 mice, *Brain Behav Immun.* **98**, 357-365.



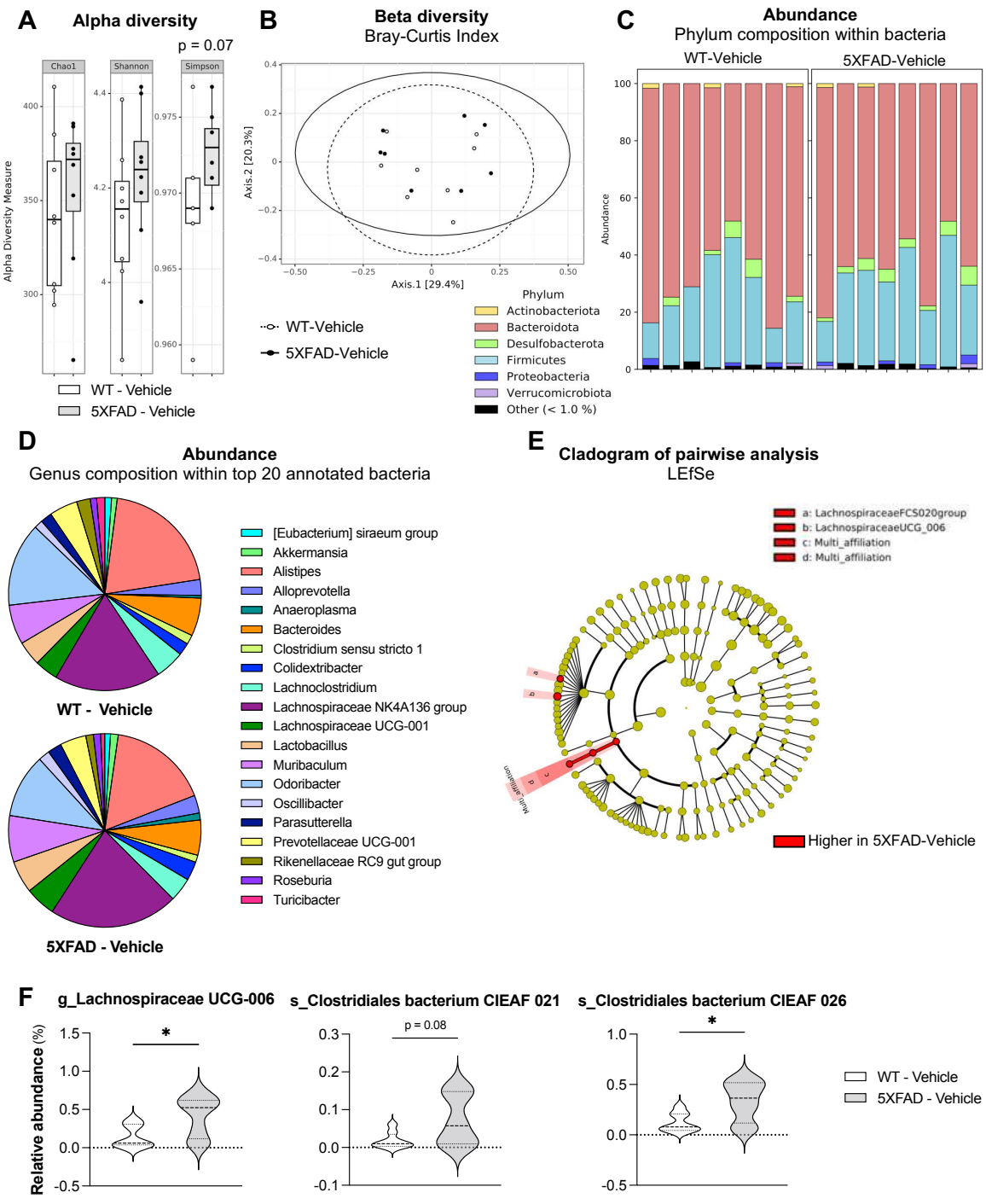
Supplementary figure 1. Design of the chronic (A) and subchronic (B) administration experiments in 5XFAD mice. NOR, Novel Object Recognition test.



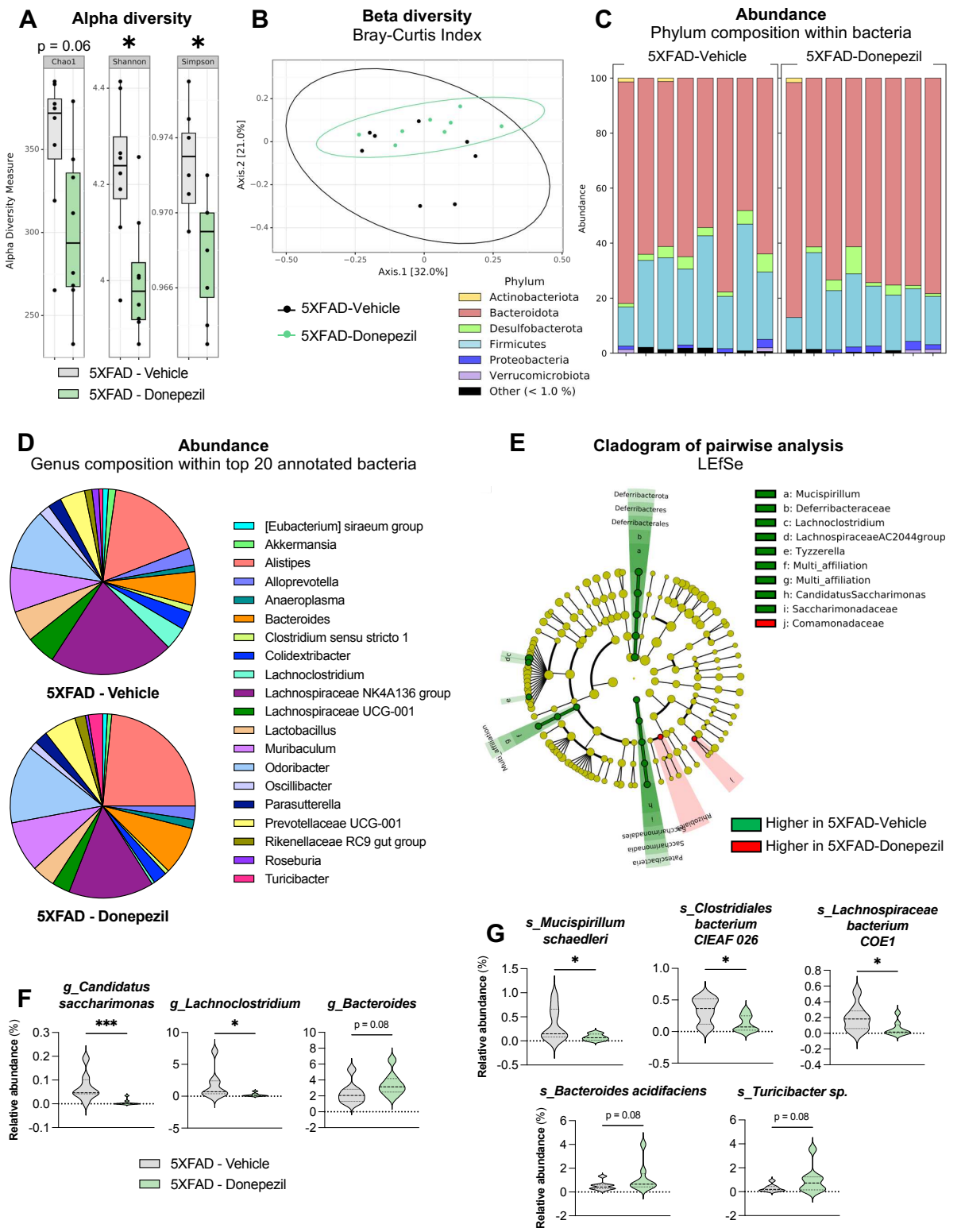
Supplementary figure 2. Effects of test items after 18 weeks of chronic treatment in 5XFAD mice. Six-week-old 5XFAD females and WT littermates were treated twice a week with donecopirdine, donepezil (1 mg/kg) or vehicle. (A) Representative epifluorescence microphotographs of thioflavin T (in green), GFAP (in red) and Hoechst staining in the hippocampus from 5XFAD mice. (B-C) Quantification of amyloid load in mouse brain extracts: human $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ (B), sAPPα and sAPPβ in soluble hippocampal fractions. (D) Immunoblot analysis of Iba1 in cortical homogenates and densitometric analysis of immunoblots (normalized by the amount of actin), with the levels in the 5XFAD-vehicle group set as 100%. *$p < 0.05$, vs. 5XFAD-vehicle (One-way ANOVA followed by Fisher's LSD test), ns: non-significant. All results are expressed as mean ± SEM, sample size is indicated within the bars. Scale bar: 200 µm. Cx: cortex; DG: hippocampal dentate gyrus; CA1-CA3: Cornu Ammonis 1 to 3 of the hippocampus; Th: thalamus; cc: corpus callosum.



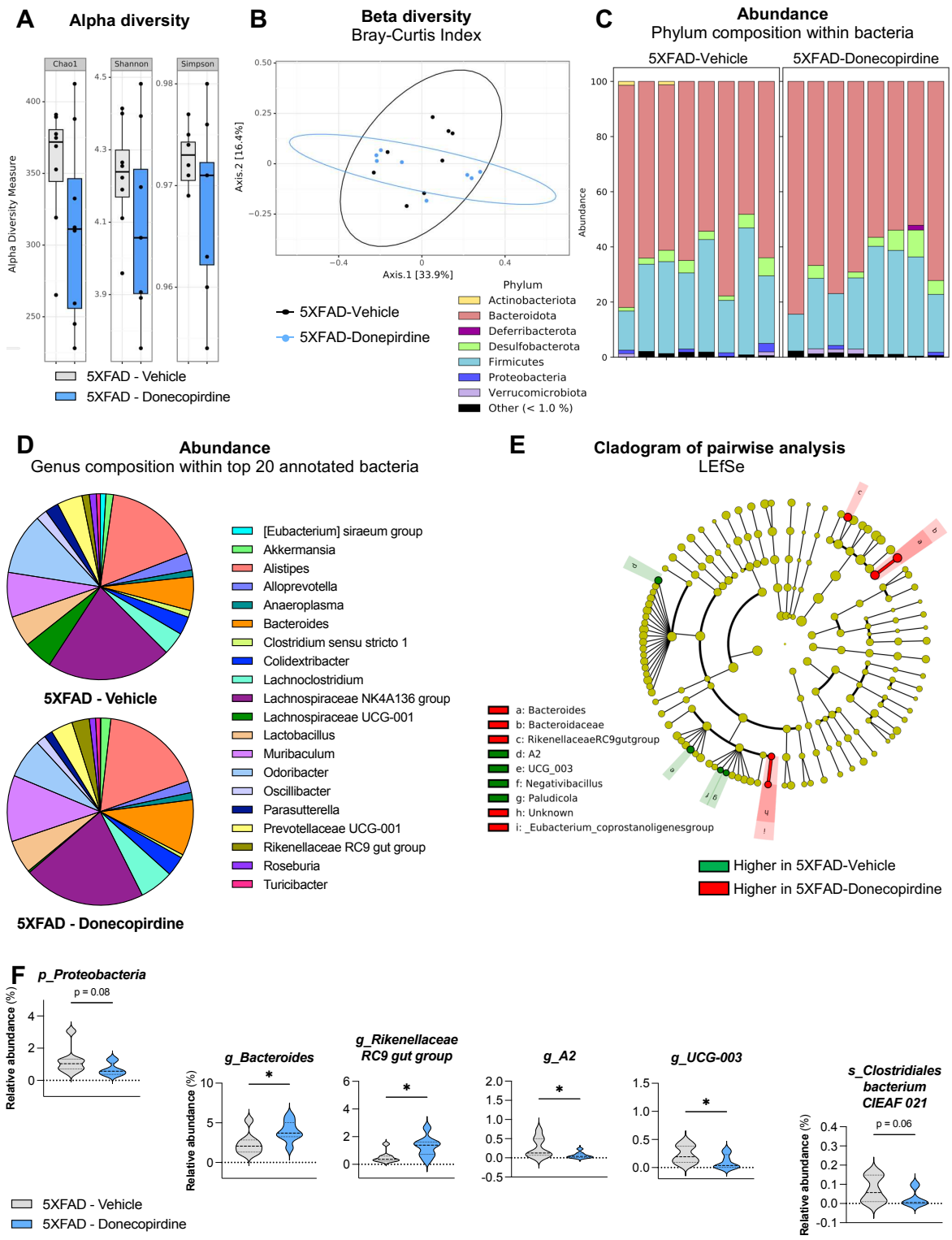
Supplementary figure 3. Fecal microbiota composition in conventionally housed 5XFAD mice and WT littermates at 6-month-old. (A) Alpha diversity as measured by Chao1's, Shannon's and Simpson's indexes. Data are presented as min to max, featuring means, each dot represents a mouse. (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). (B) Beta diversity using Bray-Curtis index. (C) Relative abundance of taxa at the phylum level. (D) Synthetic diagram presenting relative abundance of species composition within annotated bacteria. (E) Synthetic cladogram presenting dysregulated OTU and bacterial taxa increased in WT (green) or increased in 5XFAD (red) identified by LEfSe analysis.



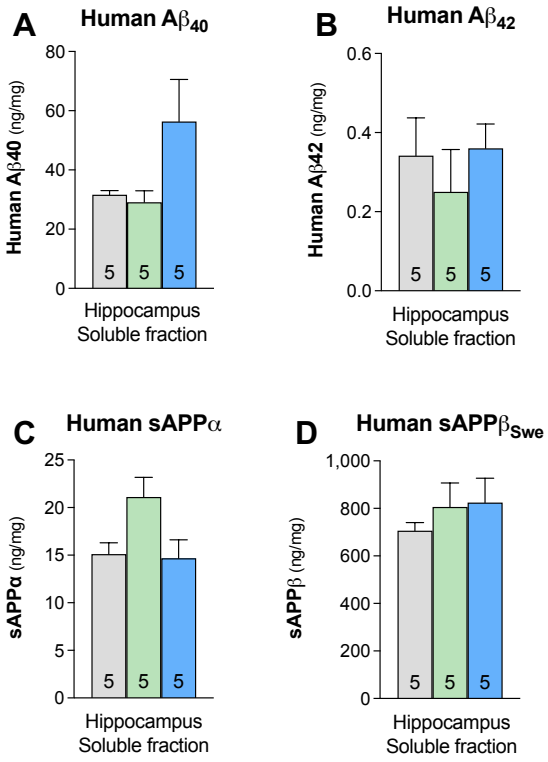
Supplementary figure 4. Fecal microbiota composition in SOPF 5XFAD mice and WT littermates at 6- month-old. (A) Alpha diversity as measured by Chao1's, Shannon's and Simpson's indexes. Data are presented as min to max, featuring means, each dot represents a mouse. (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). (B) Beta diversity using Bray-Curtis index. (C) Relative abundance of taxa at the phylum level. (D) Synthetic diagram presenting relative abundance of species composition within top 20 annotated bacteria. (E) Synthetic cladogram presenting dysregulated OTU and bacterial taxa increased in 5XFAD (red) identified by LEfSe analysis. (F) Relative abundance of modulated taxa at the genus level (g) or at the species level (s). Only the species with abundance ≥ 0,04% have been considered. Data (n = 8) are presented as violin plots featuring frequency distribution of data, median (dashed line) and quartiles (dotted line).



Supplementary figure 5. Fecal microbiota composition in SOPF 5XFAD mice after 18 weeks of chronic treatment with donepezil or vehicle. (A) Alpha diversity as measured by Chao1's, Shannon's and Simpson's indexes. Data are presented as min to max, featuring means, each dot represents a mouse. *p < 0.05 (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). (B) Beta diversity using Bray-Curtis index. (C) Relative abundance of taxa at the phylum level. (D) Synthetic diagram presenting relative abundance of species composition within top 20 annotated bacteria. (E) Synthetic cladogram presenting dysregulated OTU and bacterial taxa increased in 5XFAD-vehicle (green) or increased in 5XFAD-donepezil (red) identified by LEfSe analysis. Relative abundance of modulated taxa at the genus level (F) or at the species level (G). Only the species with abundance ≥ 0,04% have been considered. Data (n = 8) are presented as violin plots featuring frequency distribution of data, median (dashed line) and quartiles (dotted line).



Supplementary figure 6. Fecal microbiota composition in SOPF 5XFAD mice after 18 weeks of chronic treatment with donecopirdine or vehicle. (A) Alpha diversity as measured by Chao1's, Shannon's and Simpson's indexes. Data are presented as min to max, featuring means, each dot represents a mouse. *p < 0.05 (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). (B) Beta diversity using Bray-Curtis index. (C) Relative abundance of taxa at the phylum level. (D) Synthetic diagram presenting relative abundance of species composition within top 20 annotated bacteria. (E) Synthetic cladogram presenting dysregulated OTU and bacterial taxa increased in 5XFAD-vehicle (green) or increased in 5XFAD-donecopirdine (red) identified by LEfSe analysis. (F) Relative abundance of modulated taxa at the phylum level (p), genus level (g) at the species level (s). Only the species with abundance ≥ 0,04% have been considered. Data (n = 8) are presented as violin plots featuring frequency distribution of data, median (dashed line) and quartiles (dotted line).



Supplementary figure 7. Effects of test items on recognition memory of 5-month-old 5XFAD mice. 5XFAD females and WT littermates were treated with donecopirdine, donepezil (1.5 mg/kg) or vehicle, twice daily for 10 days (A-D) Quantification of amyloid load in mouse brain extracts in soluble hippocampal fractions: human $A\beta_{40}$ (A), $A\beta_{42}$ (B), sAPPα (C) and sAPPβ (D). All results are expressed as mean ± SEM, sample size is indicated within the bars.

PARTIE 3

MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR DES MODULATEURS MICROBIENS CLASSIQUES

INTRODUCTION

La pathologie amyloïde, qui est l'une des caractéristiques principales de la maladie d'Alzheimer, est associée à la composition du microbiote intestinal dans des modèles précliniques murin et en clinique humaine.

Le Dr. G. Frisonni a ainsi démontré chez des patients cognitivement altérés et présentant une amyloïdose, une augmentation au niveau du microbiote fécal des genres bactériens *Escherichia/Shigella* et une diminution du genre bactérien *Eubacterium rectale*, qui sont respectivement associés avec des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Cattaneo et al., 2017). Dans la continuité de ce travail, les études du Dr. T. Bolmont ont démontré que le modèle murin de la maladie d'Alzheimer APP/PS1 C57BL/6, élevé en condition axénique, présente une réduction drastique de la pathologie amyloïde cérébrale en comparaison à des souris non-axéniques (Harach et al., 2017). Dans ce même modèle murin mais de souche C57BL/6-C3H, le Dr. S. Sisodia a démontré qu'une déplétion du microbiote intestinal par traitement antibiotique était également en capacité de ralentir le développement de la pathologie amyloïde en comparaison à des souris contrôles (Minter et al., 2017, 2016). Parallèlement à ces travaux, nous avons mené une étude visant à analyser l'effet d'un traitement antibiotique sur la pathologie amyloïde, dans un autre modèle murin d'amyloïdose, le modèle 5XFAD C57BL/6SJL.

Par ailleurs, cette étude ayant été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. R. Burcelin qui travaille principalement sur le lien entre le microbiote intestinal et les maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 (Burcelin et al., 2011), et étant donné que de tels troubles sont des facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer (Jayaraman & Pike, 2014; Pugazhenthi et al., 2017), nous avons également étudié l'effet du traitement antibiotique dans ce modèle en présence d'une altération volontaire du métabolisme.

RESULTATS

Schéma expérimental de l'étude

Comme décrit précédemment, notre étude consiste à évaluer l'impact d'un traitement antibiotique sur la pathologie du modèle murin 5XFAD C57BL/6SJL, en présence et en absence d'une altération volontaire du métabolisme. Pour cela, des souris femelles WT ou 5XFAD ont été soumises à un régime standard ou riche en graisse de l'âge de 2 mois à l'âge de 7 mois. Sur la même durée, l'eau de boisson de certains groupes expérimentaux contenait un cocktail d'antibiotiques à base d'ampicilline, néomycine et métronidazole (Figure 1).

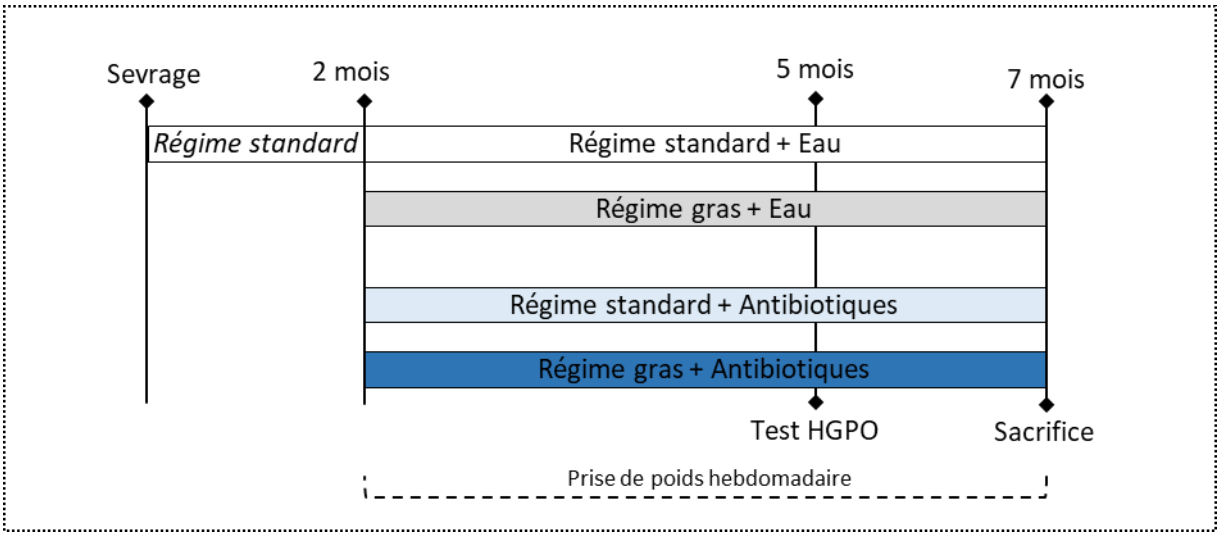


Figure 1 – Schéma expérimental de l'étude

HGPO : Test de l'hyperglycémie provoquée par voie orale

Un régime riche en graisse engendre une altération du métabolisme, indépendamment d'un traitement antibiotique

Il a été démontré qu'un régime alimentaire riche en graisse est fortement associé avec le risque de développer une obésité et un diabète de type 2 (Dam et al., 2002; Winzell & Ahrén, 2004). De ce fait, dans notre étude, afin d'engendrer une altération du métabolisme, les souris ont été soumises à un régime composé à 60% de graisse. Après 4 semaines sous ce régime alimentaire, la prise de poids des souris se distingue significativement des souris sous régime standard *(moyenne 22,30g ±0,30 vs 25,59g ±0,78 ; p-value = 0,0003)* et ce jusqu'à la fin du traitement à 28 semaines d'âge *(moyenne 28,21g ±0,79 vs 42,19g ±2,34 ; p-value < 0,0001)* [Figure 2A]. Il est intéressant de noter que de manière générale, la prise de poids des souris 5XFAD est plus basse que les souris WT, et que la prise de poids des animaux est nettement marquée à 28 semaines d'âge : 30,49g ±0,82 pour les WT *vs* 25,93g ±0,89 pour les 5XFAD *(p-*

value = 0,0014) sous régime standard, et 44,41g ±3,27 pour les WT *vs* 39,73g ±3,35 pour les 5XFAD *(non-significatif)* sous régime riche en graisse. Cette différence dans la prise de poids est une caractéristique observée dans d'autres études sur ce modèle (Gendron et al., 2021; Jawhar et al., 2012). Cette diminution de prise de poids pour les souris 5XFAD peut s'expliquer par la différence de prise alimentaire qui est plus basse chez ces souris transgéniques. En moyenne, par souris et par jour, les souris WT consomment 3,55g de nourriture contre 3,19g pour les souris 5XFAD [Figure S1].

Un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) a également été réalisé après 3 mois de traitement, à 5 mois d'âge. Ce test permet en clinique humaine de confirmer le diagnostic d'un diabète ou d'une intolérance au glucose. Il permet d'analyser la réponse de l'organisme à métaboliser le glucose suite à une prise importante (ici 30% de glucose) à jeun. D'après l'Organisme Mondial de la Santé, 2h après le test de l'HGPO, la glycémie doit être inférieure à 140mg/dL. Un taux entre 140 et 200mg/dL reflète une intolérance au glucose, et un dosage au-delà de 200mg/dL confirme le diagnostic d'un diabète (P. Zhang, 2011). Dans le cas d'un régime alimentaire standard, 2h après la prise de glucose, la glycémie moyenne des animaux est à 123 mg/dL ±4,16, et dans le cas d'un régime alimentaire riche en graisse, ce taux se trouve significativement augmenté avec une valeur de 172,1mg/dL ±8,14 *(p-value < 0,0001)* [Figure 2B].

Les groupes expérimentaux ayant reçu un cocktail d'antibiotiques dans l'eau de boisson présentent également une obésité lors d'un régime riche en graisse *(à 28 semaines d'âge, moyenne 25,02g ±0,52 pour l'ensemble des groupes sous régime standard vs 36,08g ±1,97 pour l'ensemble des groupes sous régime gras ; p-value < 0,0001)* [Figure 2C]. Ce traitement antibiotique n'empêche également pas le développement d'une intolérance au glucose *(105,9mg/dL ±3,85 pour l'ensemble des groupes sous régime standard vs 155,5mg/dL ±7,41 pour l'ensemble des groupes sous régime gras ; p-value < 0,0001)* [Figure 2D].

En résumé, ce régime alimentaire riche en graisse entraîne une altération du métabolisme, aussi bien chez les souris WT que les 5XFAD, avec un gain de poids significatif reflétant une obésité, et une intolérance au glucose, indépendamment d'un traitement antibiotique.

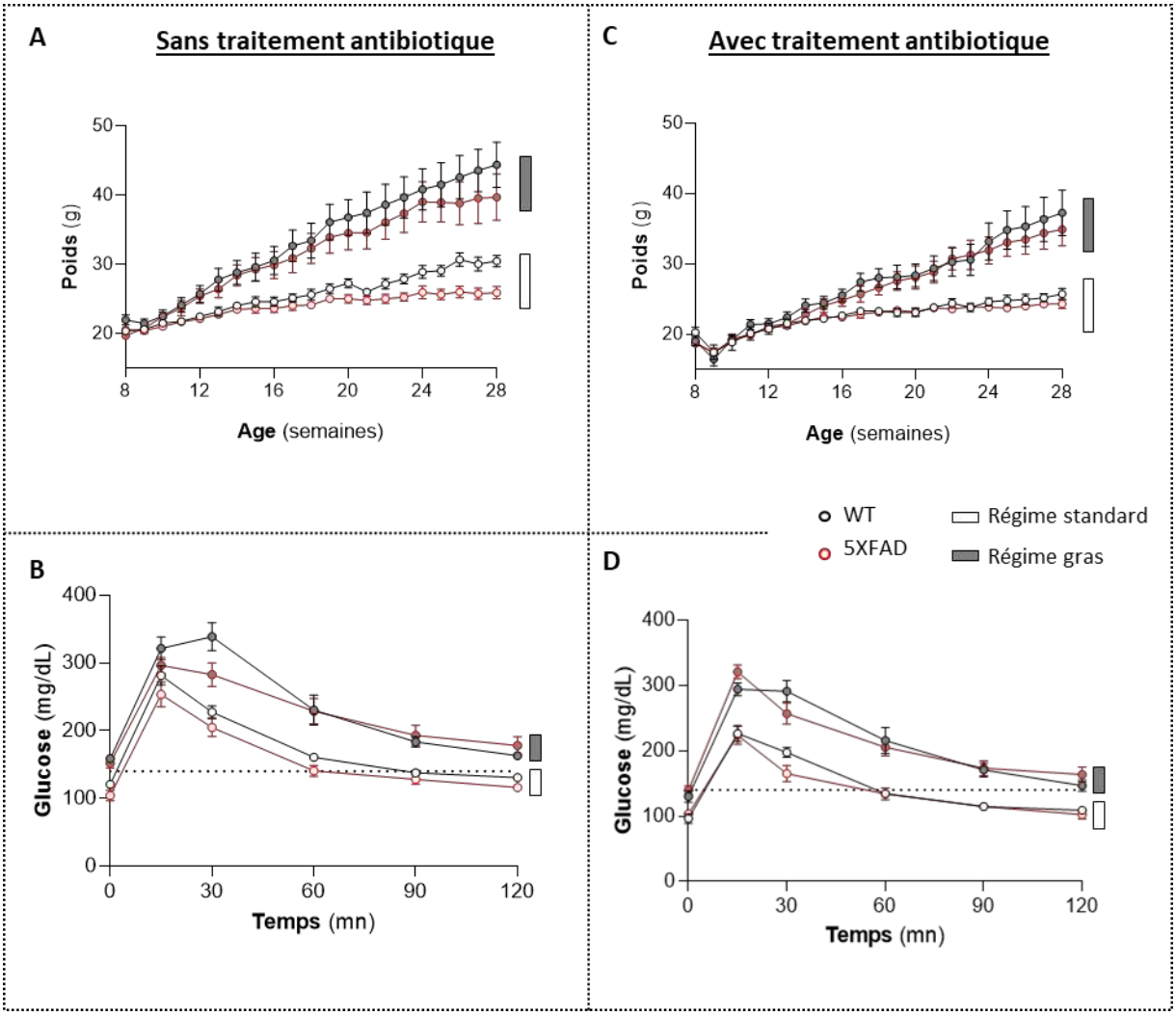


Figure 2 – Altération du métabolisme suite à un régime riche en graisse avec ou sans traitement antibiotique
Altération de la prise de poids et de la tolérance au glucose chez les souris WT et 5XFAD suite à un régime alimentaire riche en graisse avec ou sans traitement antibiotique. Prise de pois hebdomadaire (A et C) et taux de glucose sanguin dans le test de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (B et D). La ligne des graphiques des panneaux (B et D) correspond à 140mg/dL de glucose.

Le régime riche en graisse ne module pas la pathologie amyloïde des souris 5XFAD

Il a été démontré qu'un régime alimentaire riche en graisse est un facteur de risque pour développer la maladie d'Alzheimer (Pugazhenthi et al., 2017) et qu'il accélère la pathologie dans des modèles précliniques murins d'amyloïdose APP/PS1 C56BL/6 et APP^{NL-F} C57BL/6 avec une augmentation du taux des peptides β-amyloïdes, des plaques amyloïdes et de la microgliose (Bracko et al., 2020; Mazzei et al., 2021). Or, dans notre étude, aucune aggravation de la pathologie amyloïde (plaques compactes) n'est observée dans les différentes structures cérébrales analysées, suite au régime riche en graisse [Figure 3A]. De même, la microgliose n'est pas impactée au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe [Figure 3B]. Cependant, de manière étonnante, une diminution de la microgliose est observée dans le cortex entorhinal

où le nombre de cellules positives pour le marqueur microglial Iba1 revient à un niveau similaire à celui des souris WT. En résumé, le paradigme expérimental utilisé dans cette étude n'aggrave pas la pathologie amyloïde du modèle 5XFAD, mais altère la microgliose cérébrale de manière région dépendante.

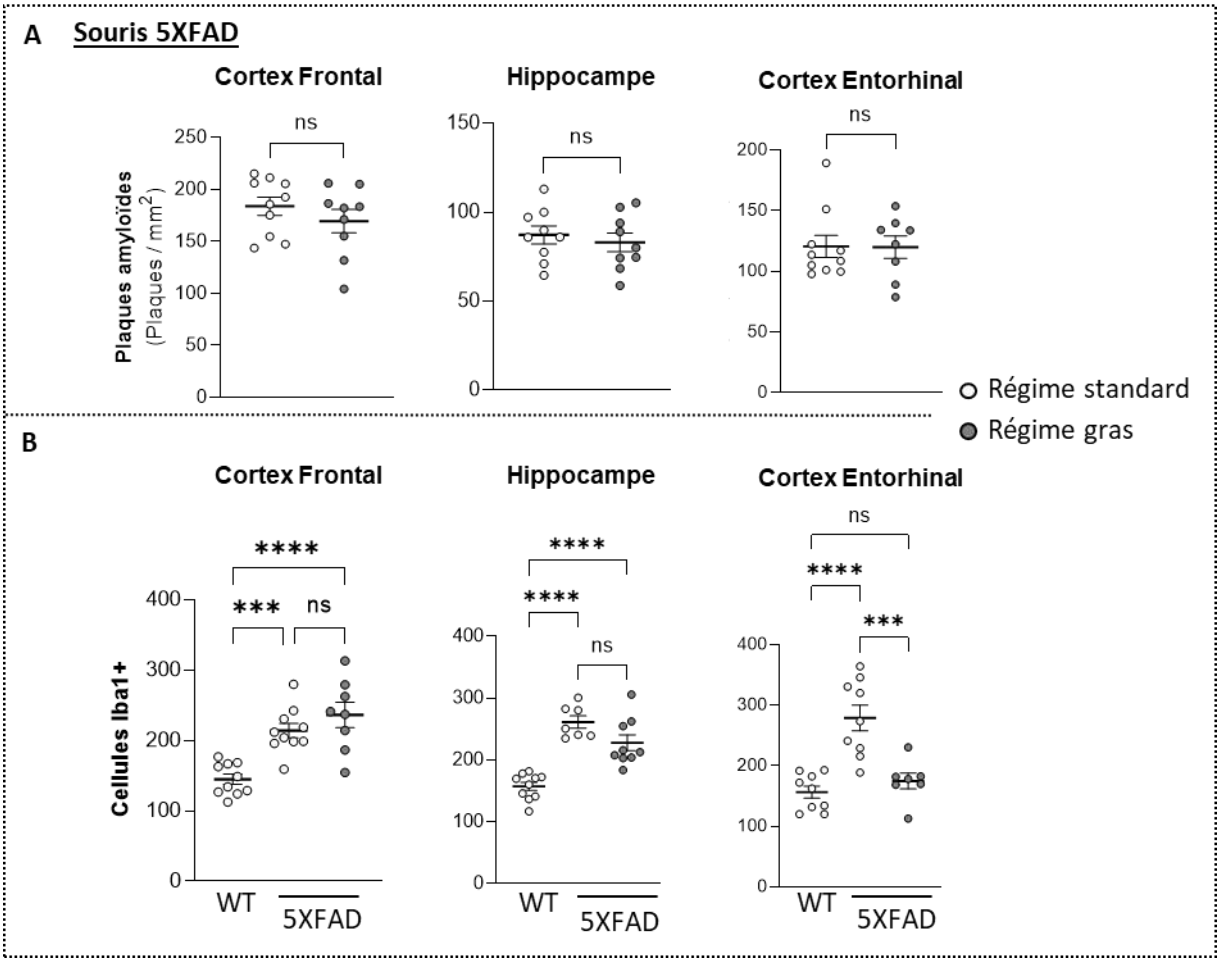


Figure 3 – Modulation de la pathologie amyloïde et de la microgliose suite à un régime riche en graisse
*Pathologie amyloïde et microgliose suite à un régime riche en graisse. Analyse du taux de plaques amyloïdes des souris 5XFAD (A) et du nombre de cellules positives pour le marqueur Iba1 chez les souris WT et 5XFAD (B) par immunomarquage au niveau du cortex frontal, de l'hippocampe et du cortex entorhinal. *p < 0,05 (Test de Student (A) et one-way ANOVA (B)).*

Le traitement antibiotique module différemment la pathologie amyloïde cérébrale des souris 5XFAD selon le régime alimentaire

Le traitement avec un cocktail antibiotique (ABX) durant 5 mois n'engendre aucune modulation de la pathologie amyloïde au niveau du cortex frontal, de l'hippocampe et du cortex entorhinal sous un régime alimentaire standard, contrairement aux études du Dr. S. Sisodia (Minter et al., 2017, 2016) [Figure 4]. Cependant, dans le cas d'un régime riche en graisse, une diminution significative du nombre de plaques amyloïdes est observée dans chacune des

structures analysées pour les souris ayant reçu le traitement antibiotique : 169,5 ±11,25 (eau) *vs* 140,2 ±6,81 (ABX) plaques/mm^2 *(p-value = 0,0358)* dans le cortex frontal, 83,05 ±5,27 (eau) *vs* 55,83 ±4,90 (ABX) plaques/mm^2 *(p-value = 0,0015)* dans l'hippocampe, et 120 ±9,18 (eau) *vs* 97,06 ±5,70 (ABX) plaques/mm^2 *(p-value = 0,0422)* dans le cortex entorhinal.

En résumé, le traitement antibiotique diminue significativement la pathologie amyloïde uniquement lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse.

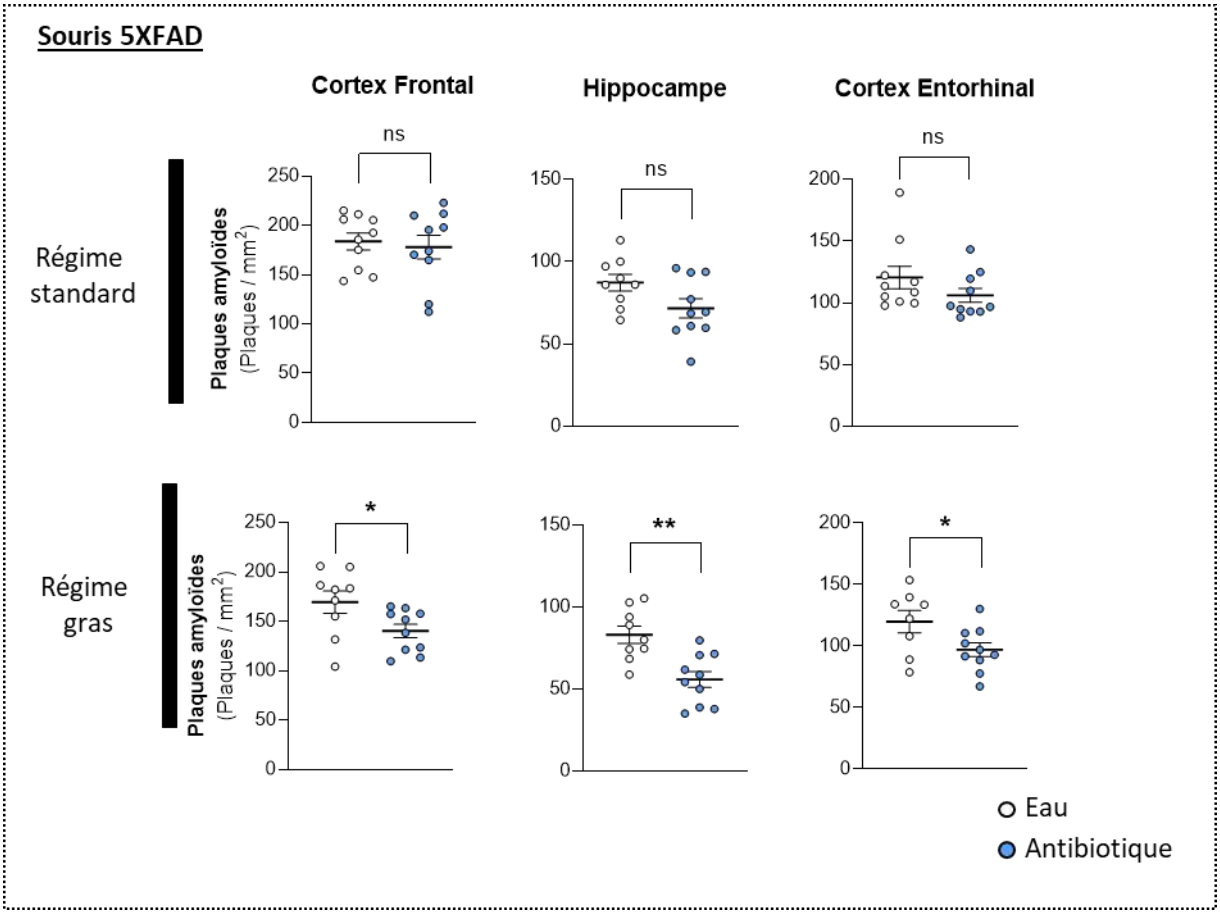


Figure 4 – Modulation de la pathologie amyloïde suite à un traitement antibiotique

*Pathologie amyloïde cérébrale chez les souris 5XFAD sous régime standard ou riche en graisse, avec ou sans traitement antibiotique. Analyse du taux de plaques amyloïdes chez les souris 5XFAD par immunomarquage au niveau du cortex frontal, de l'hippocampe et du cortex entorhinal. *p < 0,05 (Test de Student).*

Le traitement antibiotique module différemment et de manière région dépendante la microgliose des souris 5XFAD selon le régime alimentaire

Sous un régime alimentaire standard, le traitement antibiotique chez les souris 5XFAD entraîne une diminution significative de la microgliose comme le montre une analyse des niveaux d'Iba1 par PCR quantitative à partir d'extraits cérébraux *(3,047 ±0,19 (eau) vs 2,37 ±0,16 (ABX) ; p-value = 0,0144)* [Figure 5A] et l'analyse du nombre de cellules positives pour ce marqueur dans l'hippocampe *(261,5 ±9,90 (eau) vs 202,9 ±10,63 (ABX) ; p-value = 0,0015)*

[Figure 5B]. En revanche, lors d'un régime alimentaire riche en graisse, l'analyse par PCR quantitative ne montre aucune modulation significative de la microgliose, tandis que l'analyse du nombre de cellules positives pour le marqueur Iba1 montre une augmentation significative dans le cortex entorhinal *(174,8 ±13,05 (eau) vs 268,2 ±25,09 (ABX) ; p-value = 0,0091)*. Il est intéressant de noter que dans cette structure, la microgliose qui était diminuée significativement chez les souris 5XFAD suite à un régime riche en graisse [Figure 3B], se retrouve significativement augmentée en présence d'un traitement antibiotique par rapport à ce groupe expérimental [Figure 5B], revenant ainsi à un taux non-significativement différent des souris 5XFAD sous régime alimentaire standard.

En résumé, le traitement antibiotique engendre une diminution de la microgliose sous un régime standard et une augmentation de celle-ci sous un régime riche en graisse.

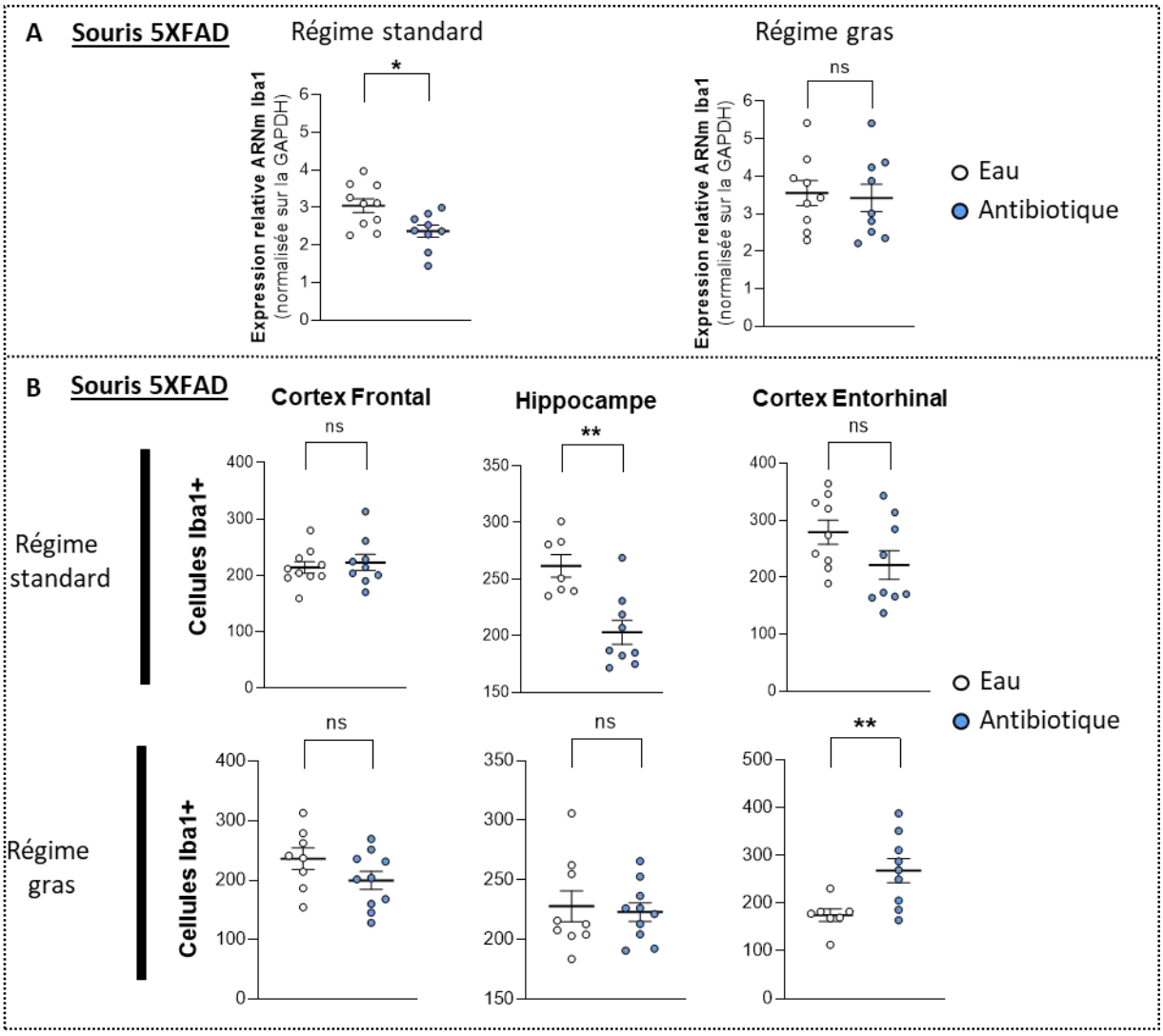


Figure 5 – Modulation de la microgliose des souris 5XFAD

Microgliose des souris 5XFAD sous régime standard ou riche en graisse, avec ou sans traitement antibiotique. Analyse de la quantité relative d'ARNm Iba1 normalisée sur la GAPDH par PCR quantitative à partir d'extraits

*cérébraux (A) et du taux de cellules positives pour Iba1 par immunomarquage au niveau du cortex frontal, de l'hippocampe et du cortex entorhinal (B). *p < 0,05 (Test de Student).*

Pour résumer brièvement les résultats obtenus lors des analyses cérébrales, un régime riche en graisse permettant d'altérer le métabolisme du modèle murin 5XFAD n'aggrave pas la pathologie amyloïde mais diminue la microgliose au niveau du cortex entorhinal. Parallèlement à ce régime alimentaire, la présence d'un traitement antibiotique est en capacité de diminuer la pathologie amyloïde et d'augmenter la microgliose au niveau du cortex entorhinal. S'appuyant sur les preuves de concepts qui lient la composition du microbiote intestinal et l'amyloïdose, des analyses métagénomiques bactériennes ont été réalisées afin d'évaluer l'implication potentielle du microbiote intestinal dans la diminution de la pathologie amyloïde dans le cas d'un régime alimentaire gras et d'un traitement antibiotique.

Le traitement antibiotique et un régime riche en graisse engendrent des modulations du microbiote bactérien intestinal

L'alpha-diversité, qui représente la diversité bactérienne en termes de richesse et d'uniformité des différentes unités taxonomiques opérationnelles (UTO) composant le microbiote intestinal pour un groupe expérimental donné, montre un effet drastique du traitement antibiotique [Figure 6A]. Nous observons une diminution significative de l'indice de Shannon chez les souris WT sous régime alimentaire standard *(4,04 ±0,06 (eau) vs 2,70 ±0,53 (ABX) ; p-value = 0,0052)* et sous régime gras *(3,88 ±0,06 (eau) vs 0,95 ±0,30 (ABX) ; p-value = 0,0009)*, et des souris 5XFAD sous régime gras *(3,85 ±0,15 (eau) vs 0,69 ±0,21 (ABX) ; p-value = 0,0004)*. De même, nous constatons une diminution significative de l'indice de Chao1 aussi bien chez les souris WT *(328,2 ±8,12 (eau) vs 231,8 ±29,23 (ABX) ; p-value = 0,0314)* et 5XFAD *(341,7 ±11,26 (eau) vs 206 ±33,91 (ABX) ; p-value = 0,0028)* sous régime standard, que sous régime gras *(298,4 ±8,95 (eau) vs 132,2 ±32,17 (ABX) ; p-value = 0,0026 pour les WT ; et 277,4 ±18,87 (eau) vs 125,4 ±17,34 (ABX) ; p-value = 0,0082 pour les 5XFAD)*.

Le régime riche en gras n'a quant à lui très que peu d'effet sur l'alpha-diversité [Figure 6B]. Nous observons une tendance à la diminution de l'indice de Shannon dans le cas d'un traitement antibiotique, et une diminution significative de l'indice de Chao1 chez les souris 5XFAD en absence de traitement antibiotique *(341,7 ±11,26 (eau) vs 277,4 ±18,87 (ABX) ; p-value = 0,0079)*.

En résumé, le traitement antibiotique diminue la diversité et la richesse bactérienne du microbiote intestinal quel que soit le régime alimentaire, contrairement à un régime alimentaire riche en graisse qui a peu d'effet sur l'alpha-diversité.

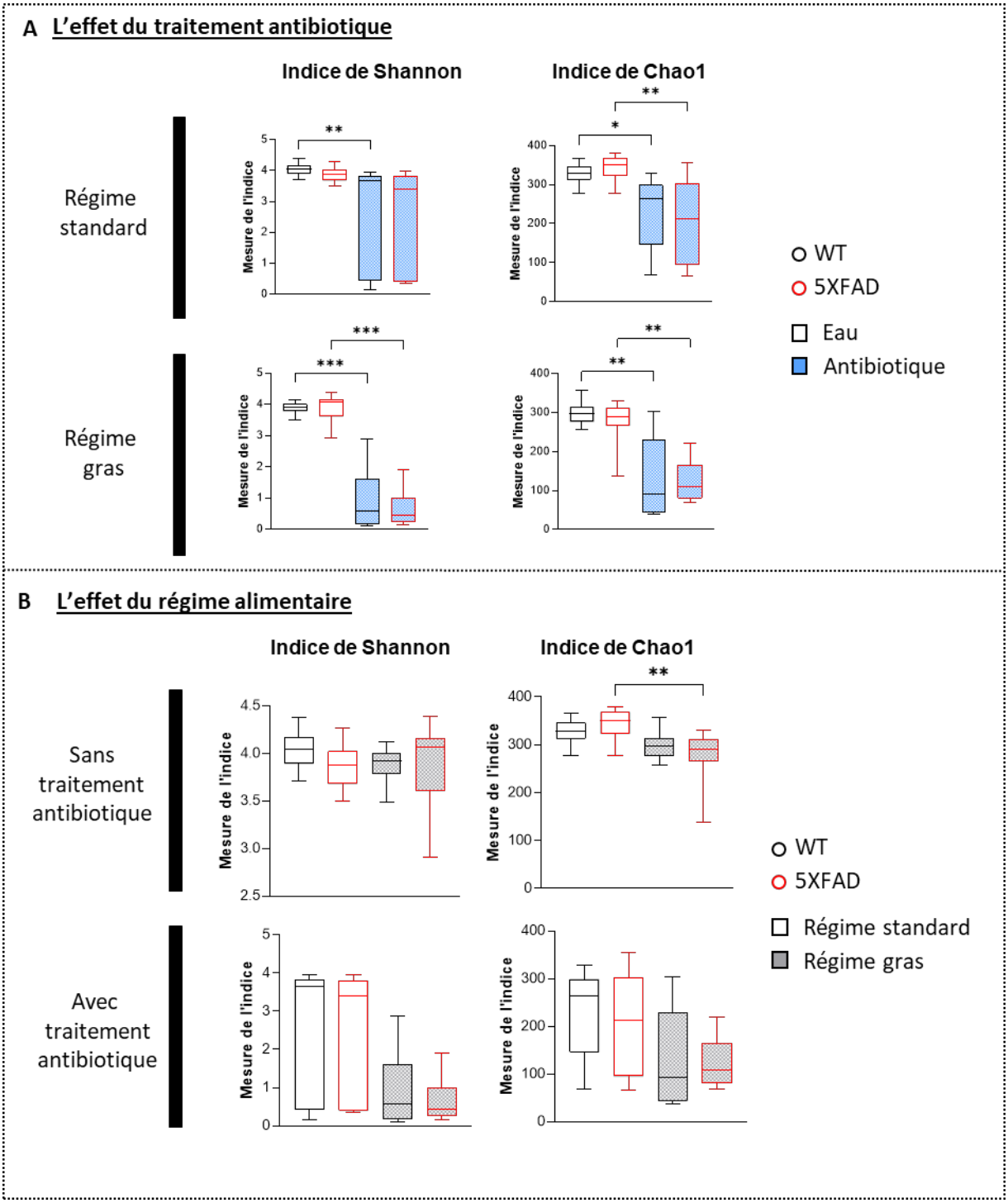


Figure 6 – Mesure de l'alpha-diversité

*Mesure de l'alpha-diversité selon les indices de Shannon et Chao1 chez les souris WT et 5XFAD, sous un régime alimentaire standard ou riche en graisse, en présence ou non d'un traitement antibiotique. *p < 0,05 (Test de Kruskal-wallis).*

L'analyse de la bêta-diversité par analyse en composantes principales montre que le traitement antibiotique engendre également une modulation significative (p-value < 0,001) de la composition du microbiote intestinal des souris WT et des souris 5XFAD quel que soit le régime alimentaire [Figure 7A]. De même, le régime alimentaire riche en graisse induit des modifications significatives (p-value < 0,001) de la composition du microbiote intestinal des souris WT et des souris 5XFAD, en présence ou absence de traitement antibiotique [Figure 7B].

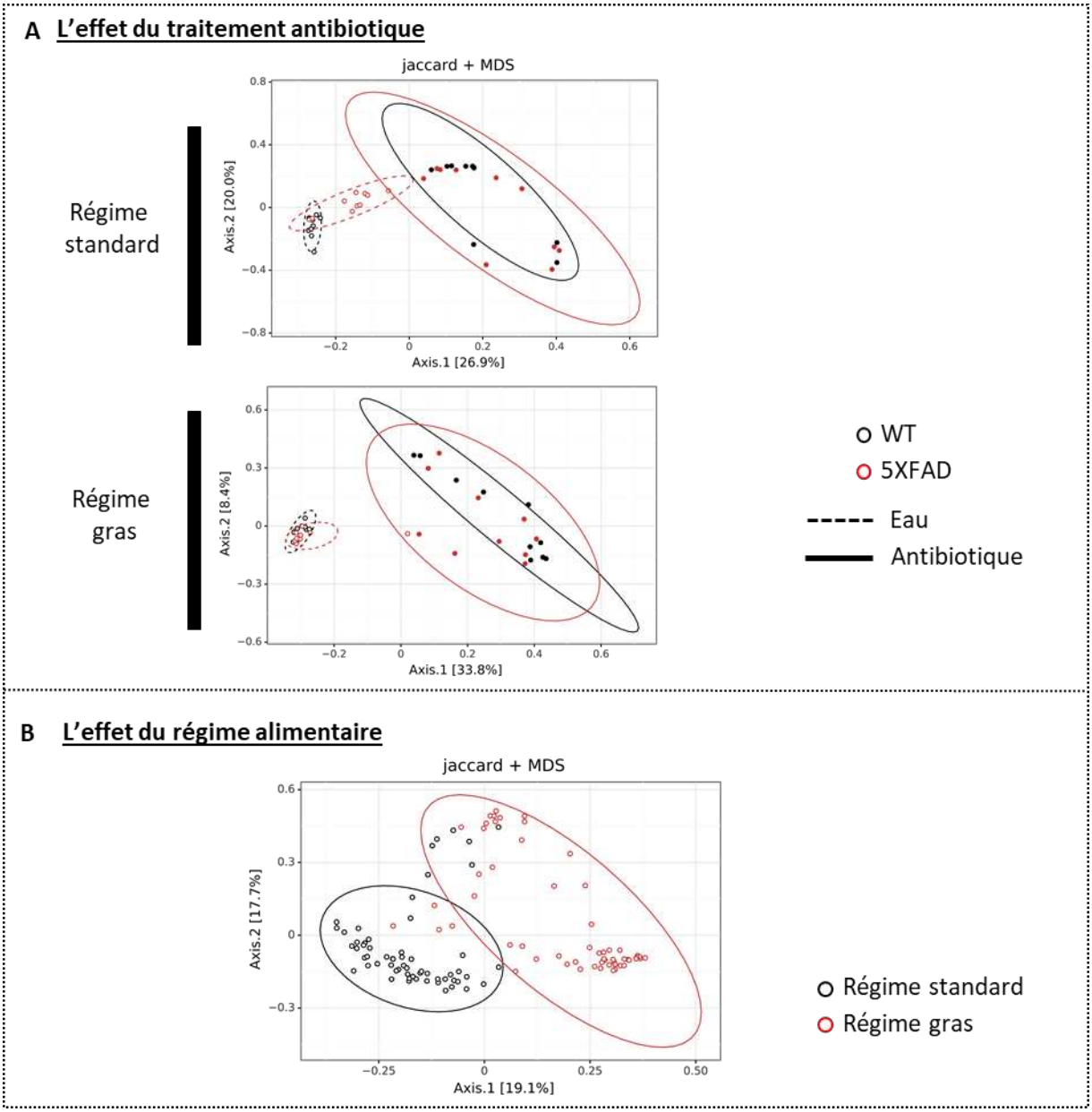


Figure 7 – Analyse de la bêta-diversité

Analyse de la bêta-diversité par analyse en composante principale avec l'indice de Jaccard chez les souris WT et 5XFAD, sous un régime alimentaire standard ou riche en graisse, en présence ou non d'un traitement antibiotique.

En résumé, le traitement antibiotique diminue la diversité bactérienne quel que soit le régime alimentaire. Un régime riche en graisse module significativement la composition du microbiote intestinal.

Le traitement antibiotique associé à une alimentation riche en graisse engendre une modulation particulière du microbiote intestinal bactérien chez les souris 5XFAD

L'analyse de l'abondance des différentes UTO des souris 5XFAD sous régime alimentaire standard montre une augmentation significative des phyla Proteobacteria et Verrucomicrobiota ; et une diminution significative du phylum Firmicutes, des familles *Lachnospiracaea* et *Ruminococacceae*, et du genre *Lachnospiraceae NK4A136 group* lors d'un traitement antibiotique [Figure 8 et Table S1]. Le régime alimentaire riche en graisse induit une augmentation significative des familles *Oscillospiraceae*, *Ruminococacceae*, et *Streptococcaceae*, et des genres *Blautia*, *Colidextribacter*, *Lactoccocus* et *Oscillibacter* ; et une diminution significative du phylum *Bacteroidota* et des genres *Lachnospiraceae NK4A136 group* et *Alistipes* [Figure 8 et Table S2]. Dans le cas d'un régime alimentaire riche en graisse, le traitement antibiotique induit une augmentation significative du phylum Firmicutes, du genre *Streptococcaceae* et du genre *Lactococcus* ; et une diminution significative des phyla Bacteroidota, Proteobacteria et Verrucomicrobiota [Figure 8 et Table S3].

En résumé, le traitement antibiotique associé à un régime alimentaire riche en graisse induit chez les souris 5XFAD une augmentation drastique du phylum Firmicutes et de la famille *Streptococcaceae* et du genre *Lactoccus* qui lui sont associés.

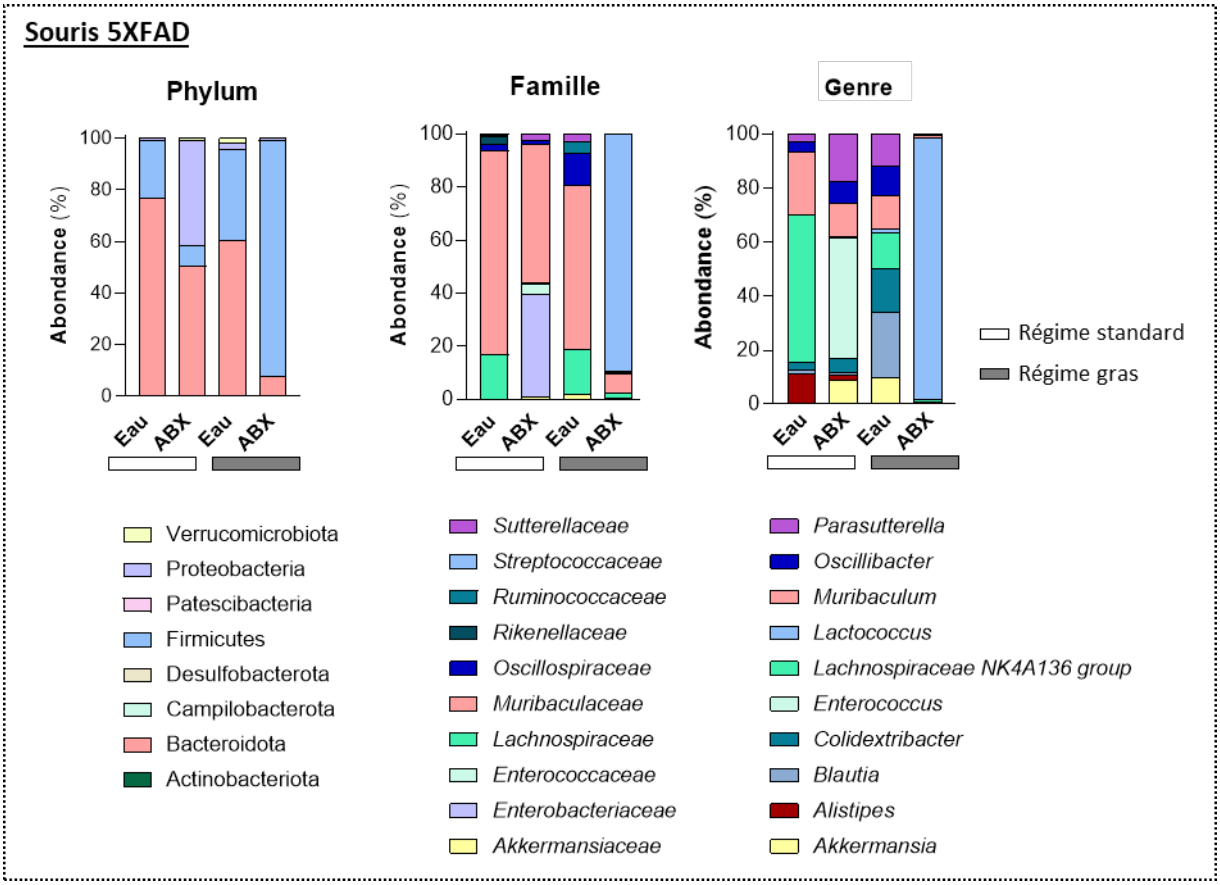


Figure 8 – Abondances relatives bactériennes chez les souris 5XFAD

Analyse des abondances relatives bactériennes au niveau du phylum, de la famille (top 10) et du genre (top 10) des souris 5XFAD soumises à un régime standard ou gras, en présence ou non d'un traitement antibiotique.
ABX : traitement antibiotique.

DISCUSSION

Les études du Dr. S. Sisodia ont démontré qu'un traitement antibiotique est en capacité de diminuer la pathologie amyloïde dans le modèle murin APP/PS1 (Minter et al., 2017, 2016) ainsi que la microgliose. Cette équipe a reproduit ces données quelques années après dans un second modèle murin, le modèle APP/PS1-21 (Dodiya et al., 2019). De même, le Dr. K. Endres, travaillant également sur le modèle murin 5XFAD, a récemment observé une diminution des plaques amyloïdes au niveau hippocampique suite à un traitement antibiotique (Guilherme et al., 2021). Cependant, dans notre étude, nous n'avons observé aucune modulation du nombre de plaques amyloïdes quelle que soit la structure cérébrale analysée. Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que notre étude a été réalisée sur des femelles, et les études précédemment citées ont toutes été réalisée sur des mâles. Par ailleurs, le Dr. S. Sisodia n'a également observé aucune modulation de la pathologie amyloïde chez les femelles APP/PS1-21 dans le même paradigme expérimental (Dodiya et al., 2019). Cette spécificité de

sexe quant à l'action du traitement peut s'expliquer par la différence de composition du microbiote bactérien intestinal entre mâles et femelles. En effet, de nombreuses études ont rapporté, aussi bien chez le rongeur qu'en clinique humaine, des différences notables de la composition du microbiote intestinal et ont également démontré que des modulateurs du microbiote intestinal (antibiotique, alimentation, environnement) exercent leur effets de manière dépendante du sexe (Valeri & Endres, 2021).

Néanmoins, dans notre étude, lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse, le traitement antibiotique est en capacité de diminuer significativement la pathologie amyloïde. Cet effet inattendu peut s'expliquer par la modulation particulière du microbiote intestinal en présence de ces deux traitements. En effet, dans de telles conditions, une augmentation drastique du phylum Firmicutes est observé. Ce dernier est connu pour être le principal producteur de butyrate (Louis & Flint, 2009, 2017), un acide gras à chaîne courte possédant de nombreux effets bénéfiques pour la santé, dont un rôle anti-agrégant pour les peptides β-amyloïdes (Ho et al., 2018). De même, nous observons une présence majoritaire de la famille *Streptoccocaceae* et du genre *Lactococcus*, qui sont en capacité de produire des vitamines, connues pour avoir des effets bénéfiques pour la maladie d'Alzheimer (R. Zhao et al., 2018). Concernant l'augmentation de la microgliose observée dans ces conditions, nous ne sommes, à ce jour, pas en mesure d'expliquer cette modulation différentielle entre la pathologie amyloïde et la quantité de cellules microgliales. En effet, une diminution de la pathologie amyloïde est généralement associée à une diminution de la neuroinflammation. Il est également intéressant de noter que dans notre étude, sous un régime riche en graisse, connu pour aggraver la pathologie amyloïde dans des modèles précliniques de la maladie d'Alzheimer (Bowen et al., 2016; Bracko et al., 2020; Mazzei et al., 2021), aucune augmentation du nombre de plaques amyloïdes compactes n'est observée. Cette différence pourrait reposer sur le fond génétique des modèles animaux utilisés. En effet, des études ont démontré que des souches différentes n'auront pas la même susceptibilité à développer des désordres métaboliques suite à un régime alimentaire riche en graisse, et présentent des différences de composition du microbiote intestinal dans des conditions standards et suite à des traitements avec des prébiotiques (Ahn et al., 2020; Ericsson et al., 2015; Safari et al., 2020). Ces paramètres jouant un rôle sur la pathologie amyloïde, il est envisageable que notre régime riche en graisse n'ait pas d'effet au niveau cérébral en raison du fond génétique C57BL/6SJL de notre modèle 5XFAD.

Pour conclure, cette étude nous a permis de montrer qu'un traitement modulant le microbiote intestinal n'aura pas le même impact sur la pathologie amyloïde selon le sexe et le régime alimentaire des animaux. Parallèlement au traitement antibiotique, un traitement utilisant un prébiotique, dont le nom est confidentiel et dont les résultats ne sont pas présentés dans cette thèse, appuie l'importance de la prise en compte du régime alimentaire. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales, ce traitement prébiotique possède, à l'inverse du traitement antibiotique, une efficacité à diminuer la pathologie amyloïde dans le cas d'un régime alimentaire standard, et ne présente aucun effet dans le cas d'un régime alimentaire riche en graisse [Figure S2].

MATERIELS & METHODES

Animaux et traitements

Des souris WT ou 5XFAD de souche C57BL/6SJL (Oakley et al., 2006) ont été nourries de l'âge de 2 mois à 7 mois avec une nourriture classique (Normal Chow, RM1, Special Diet Services) ou une nourriture riche en graisse (D12492, ResearchDiets - 20% protéines, 20% glucides, 60% graisse). Durant la même période leur boisson est composée soit d'eau, soit d'un cocktail d'antibiotiques comprenant de l'ampicilline (Euromedex EU0400), de la néomycine (Sigma N1876-100G) et du métronidazole (Sigma M3761-100G) à 1mg/mL, renouvelée deux fois par semaines.

A 7 mois d'âge, les fèces des souris ont été récupérés pour les analyses de métagénomique par séquençage de l'ARN16S bactérien, puis les souris ont été anesthésiées et soumises à une perfusion intracardiaque de PBS. Les cerveaux ont été prélevés, un hémisphère a été post-fixé en paraformaldéhyde 4% pour les analyses immunohistochimiques, et l'autre hémisphère conservé à 80°C pour des analyses par PCR quantitative.

Mesure des altérations du métabolisme

Durant toute la durée de l'étude, le poids corporel des souris a été mesuré chaque semaine et la consommation de nourriture deux fois par semaine. Après trois mois de traitement, à l'âge de 5 mois, le test HPOG a été réalisé : les souris ont été mises à jeun la veille puis ont reçu par voie orale du glucose à 30% à une dose de 1,5g/kg. La glycémie est mesurée avant l'administration de glucose puis toutes les 30 minutes après à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek performa Roche) avec une goutte de sang prélevée au niveau de la queue.

Immunomarquages et analyses microscopiques

Des coupes de 30 µm des cerveaux de souris ont été réalisés au vibratome (VT1000S, Leica) et conservées à 4°C dans un cryoprotectant. Pour l'analyse des plaques amyloïdes, les coupes ont été montées sur lames, marquées dans un bain de Thioflavine-S 1% durant 10 minutes, déshydratées dans des bains successifs de 4 minutes à l'éthanol (70%-80%-95%-100%), puis placées dans 2 bains de 5 minutes de xylène. Pour les marquages Iba1, les coupes ont été bloquées avec du peroxyde d'hydrogène 3% durant 10 minutes, lavés au PBS, bloquées par de la BSA 3% durant 1 heure, incubées avec l'anticorps Iba1 (Wako W1W 019-19741) durant une

nuit à 4°C, puis une réaction enzymatique a été réalisée avec les kits Vectastain® ABC HRP (PK-6100 Vectorlabs) et DAB (SK-4100 Vectorlabs) selon les protocoles des fournisseurs.
Les observations ont été effectuées au microscope à fluorescence (AxioImager Z1, Carl Zeiss) et les images ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji. Les données présentées correspondent à la moyenne du nombre de plaques par mm^2 dans 2 sections de la même région cérébrale pour chaque animal.

Analyses métagénomique de l'ARN 16S

L'abondance des populations bactériennes a été déterminée par séquençage haut débit de régions variables du gène de l'ARN16S, avec un protocole spécifique établi par Vaiomer. Les étapes d'extraction, la construction de la banque de données, le séquençage et le pipeline bio-informatique sont décrits dans (Besnard et al., 2018).

Test statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 8. Pour les analyses du métabolisme, des plaques amyloïdes, de la microgliose et de l'alpha-diversité, les comparaisons deux à deux ont été réalisés à l'aide du *t*-test de Student, les comparaisons multiples paramétriques en utilisant le one-way ANOVA et les comparaisons non-paramétriques avec le test de Kruskal-Wallis. La bêta-diversité a été analysée via le test statistique Permanova, et les comparaisons des abondances bactériennes par en utilisant des *t*-tests multiples suivis d'une correction de Holm-Sidak.
L'intervalle de confiance est de 95%. *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001.

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

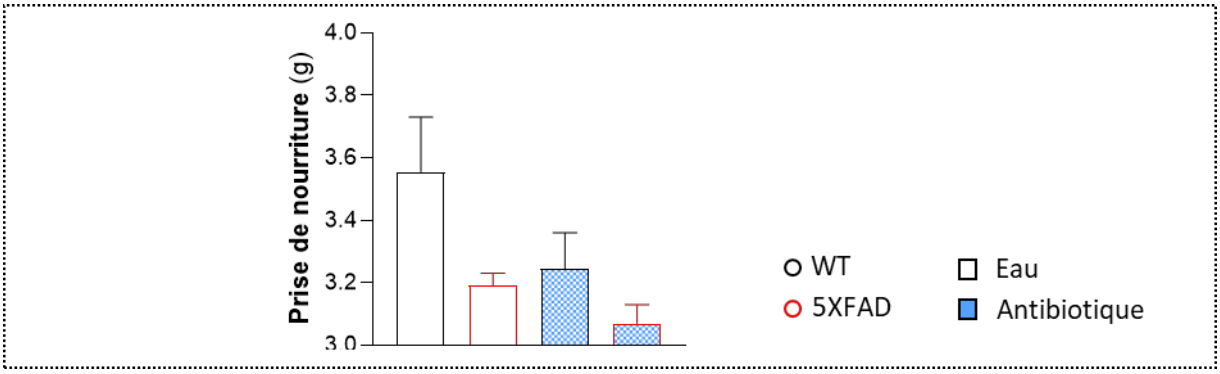


Figure supplémentaire 1 – Prise de nourriture lors d'un régime alimentaire standard

Prise de nourriture moyenne en gramme, par souris et par jour lors d'un régime alimentaire standard. Les résultats correspondent à la moyenne des deux cages pour chaque groupe expérimental.

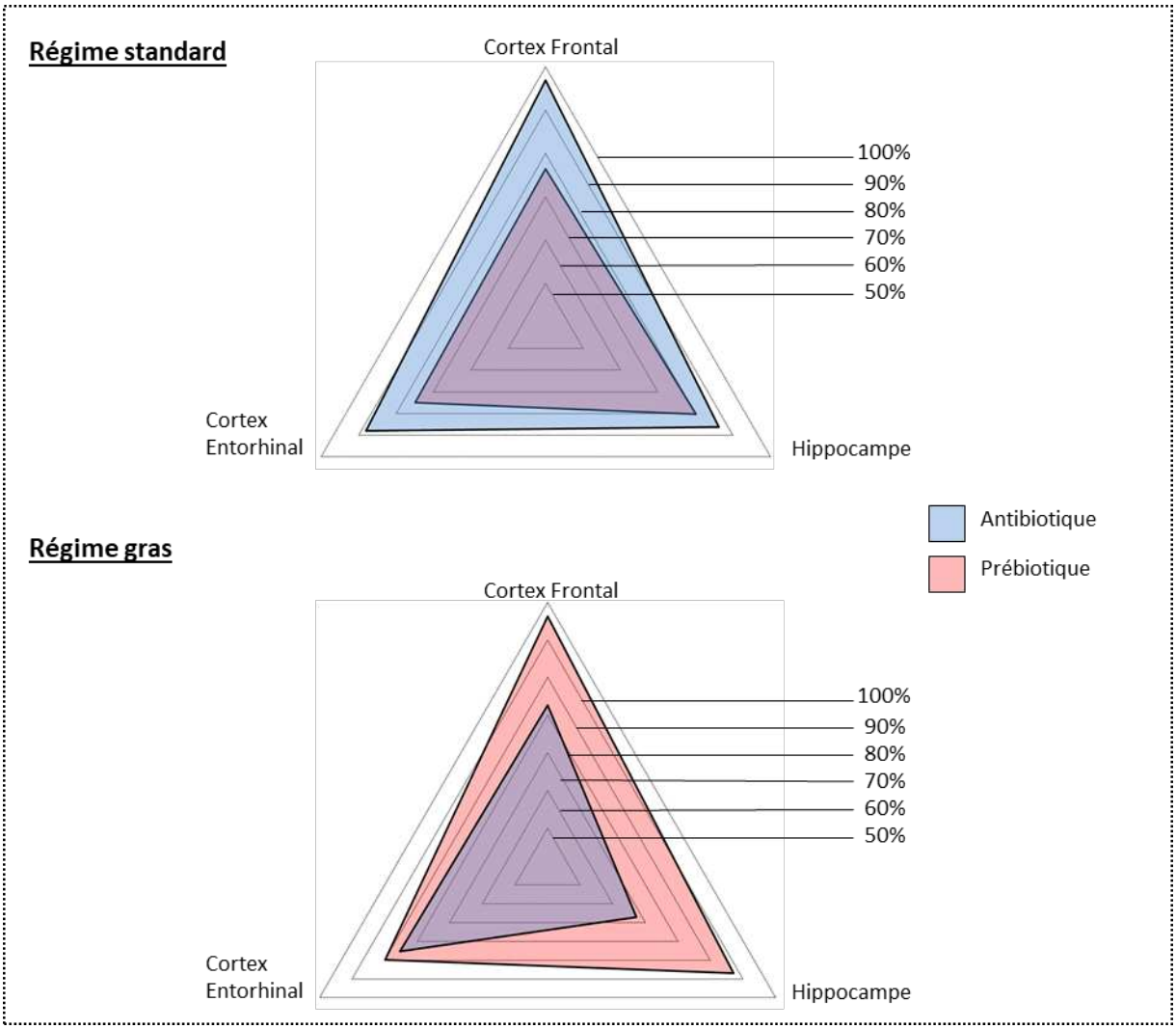


Figure supplémentaire 2 – Modulation de la pathologie amyloïde lors d'un traitement de prébiotique

Pathologie amyloïde cérébrale chez les souris 5XFAD sous régime standard ou riche en graisse, avec traitement antibiotique ou prébiotique. Les résultats sont représentés en % par rapport au groupe contrôle (souris 5XFAD sans traitement dans l'eau de boisson).

	Eau	Antibiotique	
Phylum	**Moyenne**	**Moyenne**	**p-value ajustée**
Actinobacteriota	0,00	0,30	0,19354
Bacteroidota	77,05	50,25	0,18738
Campilobacterota	0,00	0,00	
Desulfobacterota	0,00	0,01	0,19354
Firmicutes	22,42	7,85	0,00036***
Patescibacteria	0,00	0,00	
Proteobacteria	0,52	40,74	0,04223*
Verrucomicrobiota	0,00	0,85	0,04223*
Famille			
Akkermansiaceae	0,00	0,89	0,06750
Enterobacteriaceae	0,00	38,52	0,06838
Enterococcaceae	0,02	4,26	0,06750
Lachnospiraceae	16,89	0,46	0,00007****
Muribaculaceae	76,87	51,87	0,33805
Oscillospiraceae	2,25	1,40	0,40521
Rikenellaceae	3,16	0,23	0,06750
Ruminococcaceae	0,25	0,02	0,00012***
Streptococcaceae	0,01	0,00	0,40521
Sutterellaceae	0,54	2,35	0,33805
Genre			
Akkermansia	0,00	9,08	0,12914
Alistipes	11,14	1,88	0,14157
Blautia	1,43	0,61	0,69659
Colidextribacter	3,00	5,58	0,69659
Enterococcus	0,07	44,40	0,06521
Lachnospiraceae NK4A136 group	54,33	0,51	<0,000001****
Lactococcus	0,05	0,03	0,69659
Muribaculum	23,46	12,63	0,29287
Oscillibacter	3,97	7,83	0,69659
Parasutterella	2,54	17,44	0,27163

Table supplémentaire 1 – Abondance relative des souris 5XFAD sous régime standard en présence ou absence d'un traitement antibiotique

Phylum	Standard Moyenne	Gras Moyenne	p-value ajustée
Actinobacteriota	0,00	0,01	0,24831
Bacteroidota	77,05	60,50	0,00998**
Campilobacterota	0,00	0,00	
Desulfobacterota	0,00	0,00	
Firmicutes	22,42	35,11	0,06460
Patescibacteria	0,00	0,00	
Proteobacteria	0,52	2,71	0,24831
Verrucomicrobiota	0,00	1,67	0,07769
Famille			
Akkermansiaceae	0,00	1,72	0,12139
Enterobacteriaceae	0,00	0,00	0,85481
Enterococcaceae	0,02	0,00	0,50563
Lachnospiraceae	16,89	16,94	0,98836
Muribaculaceae	76,87	62,19	0,05102
Oscillospiraceae	2,25	11,88	0,00151**
Rikenellaceae	3,16	0,01	0,05102
Ruminococcaceae	0,25	4,34	0,00009****
Streptococcaceae	0,01	0,22	0,00775**
Sutterellaceae	0,54	2,71	0,47756
Genre			
Akkermansia	0,00	9,89	0,06683
Alistipes	11,14	0,03	0,03332
Blautia	1,43	23,97	0,00002****
Colidextribacter	3,00	16,20	0,00016***
Enterococcus	0,07	0,01	0,29646
Lachnospiraceae NK4A136 group	54,33	13,51	0,00002****
Lactococcus	0,05	1,31	0,02466*
Muribaculum	23,46	12,54	0,25807
Oscillibacter	3,97	10,88	0,02786*
Parasutterella	2,54	11,67	0,24927

Table supplémentaire 2 – Abondance relative des souris 5XFAD sans traitement antibiotique, sous régime standard ou riche en graisse

Phylum	Standard Moyenne	Gras Moyenne	p-value ajustée
Actinobacteriota	0,30	0,05	0,45392
Bacteroidota	50,25	7,52	0,03851*
Campilobacterota	0,00	0,00	
Desulfobacterota	0,01	0,01	0,81008
Firmicutes	7,85	91,63	<0,000001****
Patescibacteria	0,00	0,03	0,26091
Proteobacteria	40,74	0,74	0,04366*
Verrucomicrobiota	0,85	0,02	0,04375*
Famille			
Akkermansiaceae	0,89	0,02	0,07827
Enterobacteriaceae	38,52	0,28	0,08486
Enterococcaceae	4,26	0,02	0,07068
Lachnospiraceae	0,46	1,91	0,27395
Muribaculaceae	51,87	7,39	0,05463
Oscillospiraceae	1,40	0,43	0,27570
Rikenellaceae	0,23	0,17	0,78160
Ruminococcaceae	0,02	0,16	0,27395
Streptococcaceae	0,00	89,50	<0,000001****
Sutterellaceae	2,35	0,11	0,27395
Genre			
Akkermansia	9,08	0,02	0,11526
Alistipes	1,88	0,16	0,54553
Blautia	0,61	0,42	0,82908
Colidextribacter	5,58	0,15	0,15423
Enterococcus	44,40	0,03	0,06478
Lachnospiraceae NK4A136 group	0,51	0,74	0,82908
Lactococcus	0,03	97,35	<0,000001****
Muribaculum	12,63	0,84	0,09159
Oscillibacter	7,83	0,15	0,15423
Parasutterella	17,44	0,13	0,14458

Table supplémentaire 3 – Abondance relative des souris 5XFAD avec traitement antibiotique, sous régime standard ou riche en graisse

PARTIE 4

MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR TRANSPLANTATION FECALE

Une analyse préalable réalisée au sein de notre équipe en 2015 nous a permis de démontrer que le modèle murin 5XFAD C57BL/6SJL présente en animalerie conventionnelle une dysbiose du microbiote bactérien intestinal en comparaison à des souris saines [Figure 1]. Brièvement, nous avons montré que cette dysbiose est présente dès 2 mois d'âge et s'observe à différents niveaux de la classification taxonomique. De même, avec le vieillissement, la composition de ce microbiote évolue aussi bien chez les souris WT que 5XFAD, et les souris 5XFAD présentent toujours un microbiote dysbiotique.

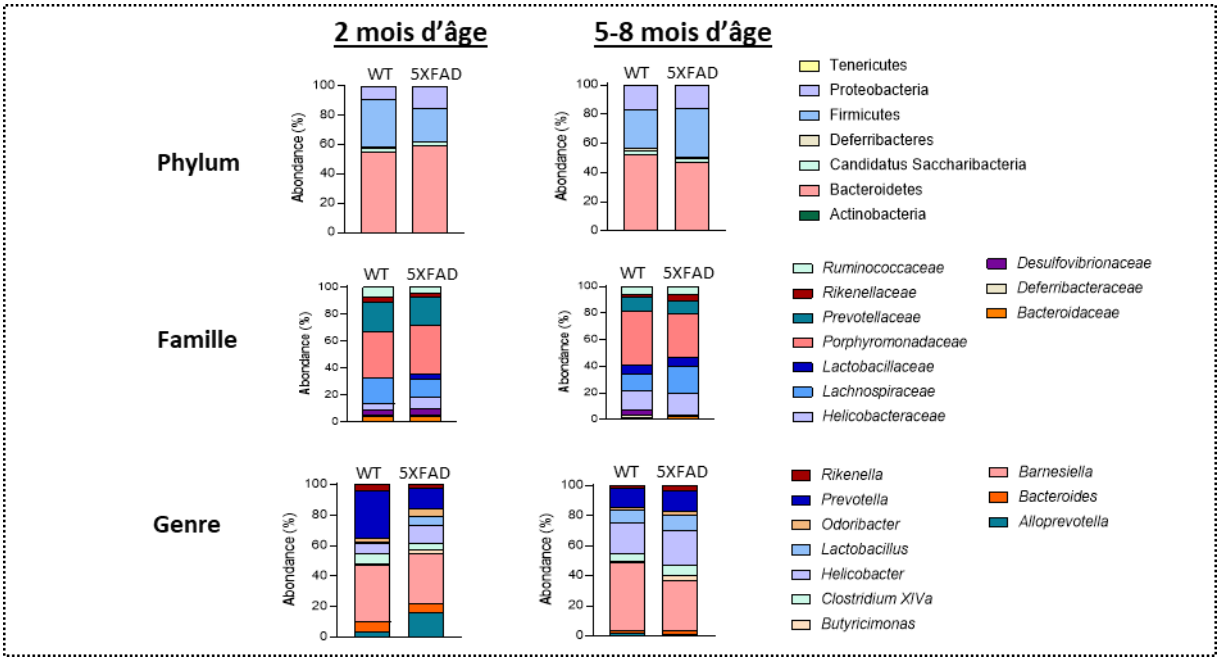


Figure 1 –Abondance bactérienne du microbiote intestinal (top 10)
Analyse métagénomique de l'ARN16S de souris WT et 5XFAD à 2 mois et 5-8 mois d'âge.

Le microbiote intestinal étant perçu comme un nouvel acteur clé des pathologies neurologiques (Cryan et al., 2019; Hsiao et al., 2013; Sampson et al., 2016), l'équipe a souhaité étudier l'implication du microbiote dysbiotique des souris 5XFAD dans le développement de la pathologie de ce modèle. Nous avons ainsi réalisé deux sous-études : d'une part l'évaluation de la causalité d'un microbiote dysbiotique dans le développement des altérations cognitives par transplantation du microbiote intestinal de souris 5XFAD dans des souris saines, et d'autre part, l'évaluation d'une éventuelle restauration d'un microbiote dysbiotique par transplantation d'un microbiote provenant de souris saines dans des souris 5XFAD.

Étude de causalité utilisant le microbiote intestinal de souris 5XFAD

Une étude a démontré que la transplantation, à des souris saines, de microbiote intestinal provenant d'un personne obèse est en capacité d'induire une prise de poids chez les animaux, démontrant que le microbiote impacte la physiologie (Ridaura et al., 2013). L'équipe du Dr. H. Hsiao a quant à elle démontré que la composition du microbiote et les métabolites qu'il produit peut influer sur le comportement de type troubles du spectre de l'autisme dans un modèle animal d'autisme (Hsiao et al., 2013). En se basant sur ces travaux, l'équipe a évalué l'impact d'un transfert du microbiote intestinal provenant de souris 5XFAD à des souris saines sur les performances cognitives des animaux receveurs.

Pour cela, des souris saines de 8 semaines d'âge ont reçu par administration orale, deux fois par semaine et durant 2 mois, du microbiote intestinal provenant de souris littermates WT ou 5XFAD, âgées de 2 ou 6 mois [Figure 2]. Les performances cognitives des souris receveuses ont ensuite été évaluées avec le test de reconnaissance du nouvel objet.

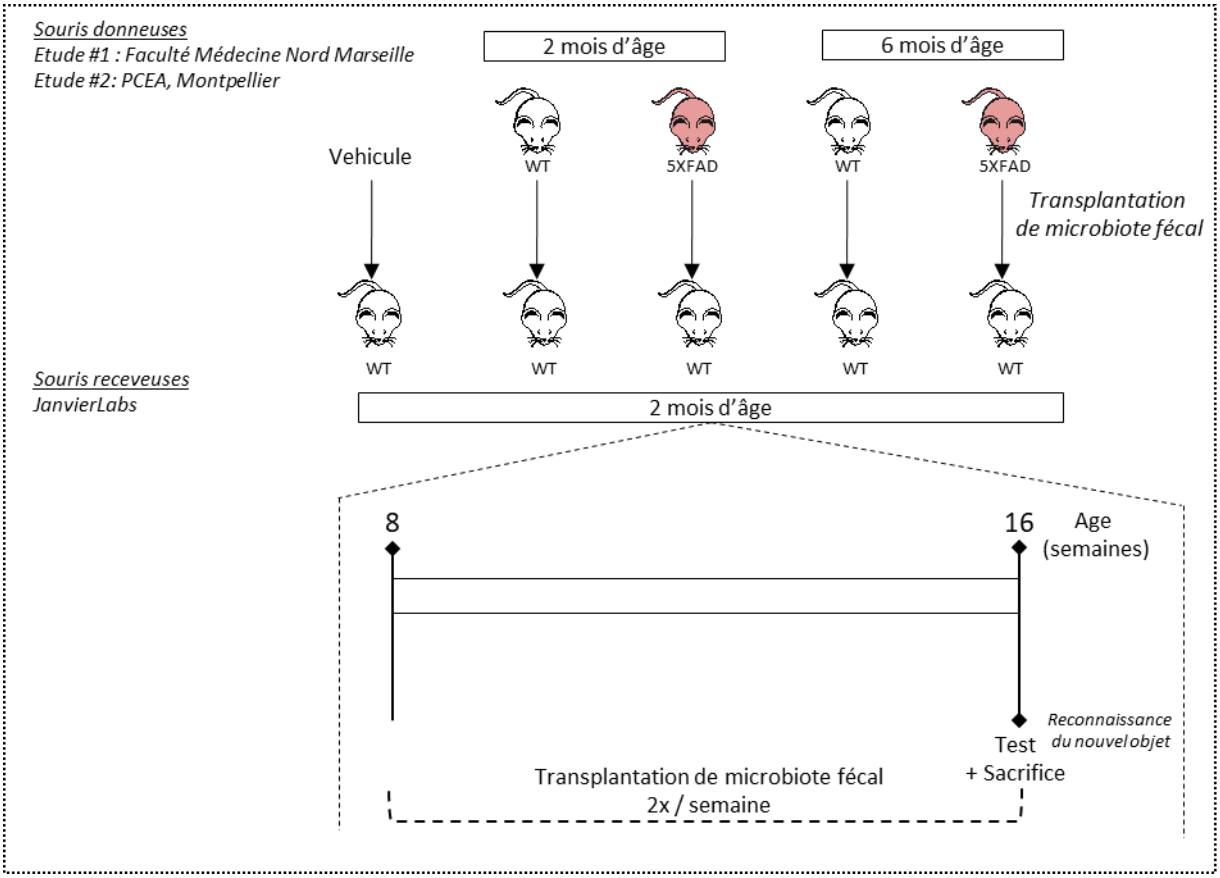


Figure 2 – Schéma expérimental de l'étude #1 et #2

Études #1 et #2

Traitement

Pour la préparation du microbiote, après anesthésie irréversible, le contenu du colon a été resuspendu dans du PBS stérile, centrifugé 2 mn à 800 g à 4°C puis aliquoté et conservé à -20°C. Au moment du traitement, un aliquot a été dégelé et dilué au 1/10 dans du PBS stérile, puis 100 µL de solution a été administrée à chaque souris. Les souris contrôles ont reçu en parallèle 100 µL de PBS stérile.

Performances cognitives

L'étude #1, préalable à mes travaux de thèse et réalisée en 2015, démontre que la transplantation du microbiote intestinal de souris WT âgées de 2 mois n'altère pas les performances mnésiques des souris receveuses dans le test de reconnaissance du nouvel objet [Figure 3]. Cependant, la transplantation de microbiote de souris WT âgées de 6 mois ou de souris 5XFAD âgées de 2 ou 6 mois, entraîne un déficit mnésique chez les souris receveuses.

L'altération des performances cognitives suite à la transplantation du microbiote intestinal de souris 5XFAD suggère que la composition de ce microbiote dysbiotique joue un rôle prépondérant dans le développement de la pathologie au niveau cognitif. Concernant l'altération cognitive induite par la transplantation de microbiote intestinal de souris WT de 6 mois d'âge, nous pouvons penser que l'implantation chez des souris jeunes (2 mois) d'un microbiote plus âgé (6 mois), malgré que celui-ci provienne de souris saines, peut entraîner une altération des fonctions cognitives.

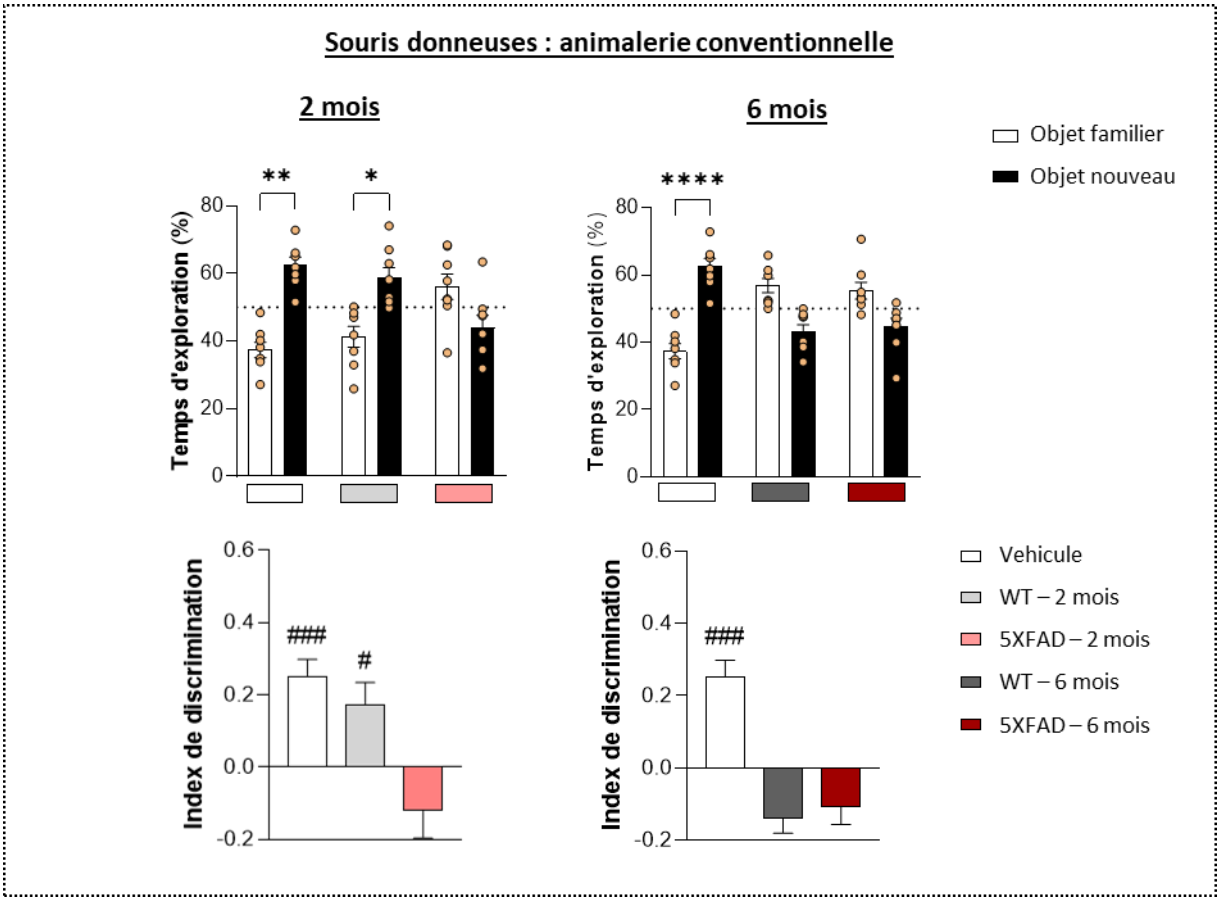


Figure 3 – Test de reconnaissance du nouvel objet de l'étude #1

Analyse du temps d'exploration de l'objet familier et de l'objet nouveau exprimée en % du temps total d'exploration (la ligne correspond à 50% de temps d'exploration) et analyse de l'index de discrimination.
*n = 5-8 par groupe. * p < 0,05 (two-way ANOVA), # p < 0,05 (one sample t-test par rapport à 0).*

Pour cette première étude, la lignée 5XFAD était sous un fond génétique C57BL/6SJL. Elle a par la suite été croisée de manière à obtenir une lignée sous fond C57BL/6. Comme décrit dans notre revue, ce changement de fond génétique entraîne un retard d'environ 1 mois dans la pathologie (Ismeurt et al., 2020). Il faut également noter que dans cette première étude, les souris donneuses issues d'une collaboration avec l'Institut de Neurophysiopathologie (INP) provenaient de l'animalerie Faculté de Médecine Secteur Nord de Marseille qui est une animalerie conventionnelle. Cependant, en raison du déménagement de l'INP sur le site de la Timone et à la fermeture anticipée de cette animalerie, nous avons en 2016 initié la redérivation de la lignée 5XFAD sur le Plateau du Centre d'Elevage et d'Archivage (PCEA, CNRS, Montpellier) qui est une animalerie possédant un statut sanitaire SOPF (Specific and Opportunist Pathogen-Free). Dans cet environnement SOPF, nous avons observé un retard d'un mois supplémentaire sur la pathologie du modèle 5XFAD (résultats non-montrés).

Cette redérivation entraînant nécessairement une modification du microbiote intestinal, et le changement de fond génétique modifiant également sa composition (Ahn et al., 2020; Ericsson et al., 2015; Safari et al., 2020) l'étude a été réitérée afin d'analyser si les altérations cognitives induites par la transplantation du microbiote intestinal des souris 5XFAD sont maintenues.

Dans le même paradigme mais en utilisant le microbiote fécal de souris donneuses de statut SOPF et de fond C57BL/6, les résultats ont été très surprenants et inattendus. En effet, la transplantation du microbiote intestinal provenant de souris 5XFAD, de 2 ou 6 mois d'âge, n'altère pas les performances mnésiques dans le test de reconnaissance du nouvel objet, tandis que le microbiote provenant de souris WT de 2 ou 6 mois d'âge impacte la cognition.

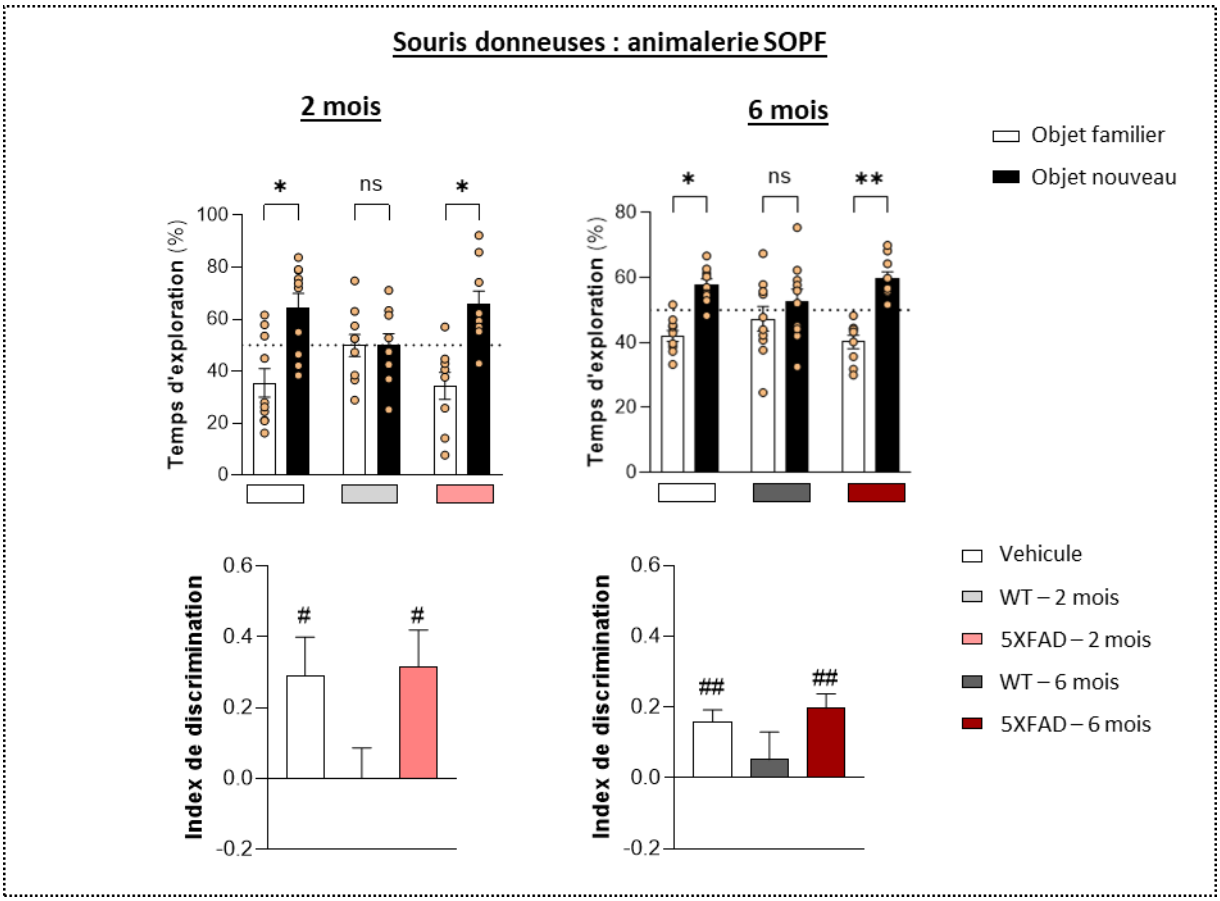


Figure 4 – Test de reconnaissance du nouvel objet de l'étude #2

Analyse du temps d'exploration de l'objet familier et de l'objet nouveau exprimée en % du temps total d'exploration (la ligne correspond à 50% de temps d'exploration) et analyse de l'index de discrimination.
*n = 5-8 par groupes. * p < 0,05 (two-way ANOVA), # p < 0,05 (one sample t-test par rapport à 0)*
SOPF: Specific and Opportunist Pathogen-Free

Dans de telles conditions, nous suggérons que le microbiote intestinal provenant des souris 5XFAD C57BL/6 ne présente pas les facteurs ayant été en capacité d'induire des altérations

cognitives dans l'étude précédente. Ces facteurs peuvent correspondre à des populations bactériennes, à des métabolites bactériens, mais également aux autres micro-organismes composant le microbiote intestinal tels que les virus ou parasites. En effet, l'animalerie Fac. Nord de Marseille étant une animalerie conventionnelle, l'analyse du statut sanitaire [Figure S1] démontre la présence de parasites et virus qui sont absents dans les animaleries SOPF telles que le PCEA de Montpellier.

Concernant l'altération cognitive induite par la transplantation de microbiote WT, nous ne sommes à ce jour pas en capacité de comprendre les résultats obtenus. Des analyses au niveau cérébral des souris receveuses suite à la transplantation, mais également une analyse de la modulation de la composition de leur microbiote intestinal nous permettrait de mieux comprendre les résultats obtenus.

Etude #3

De ce fait, l'étude a été réitérée avec un programme expérimental incluant des prélèvements fécaux avant et après la transplantation de microbiote fécal afin de bien cerner la modulation induite pas la transplantation. Par ailleurs, en raison de l'expansion des recherches associant le microbiote intestinal et les pathologies neurologiques qui a apporté de nouvelles données dans la littérature, des modifications dans le protocole de préparation des suspensions du microbiote et dans le procédé d'administration ont été implémentées [Figure 5].

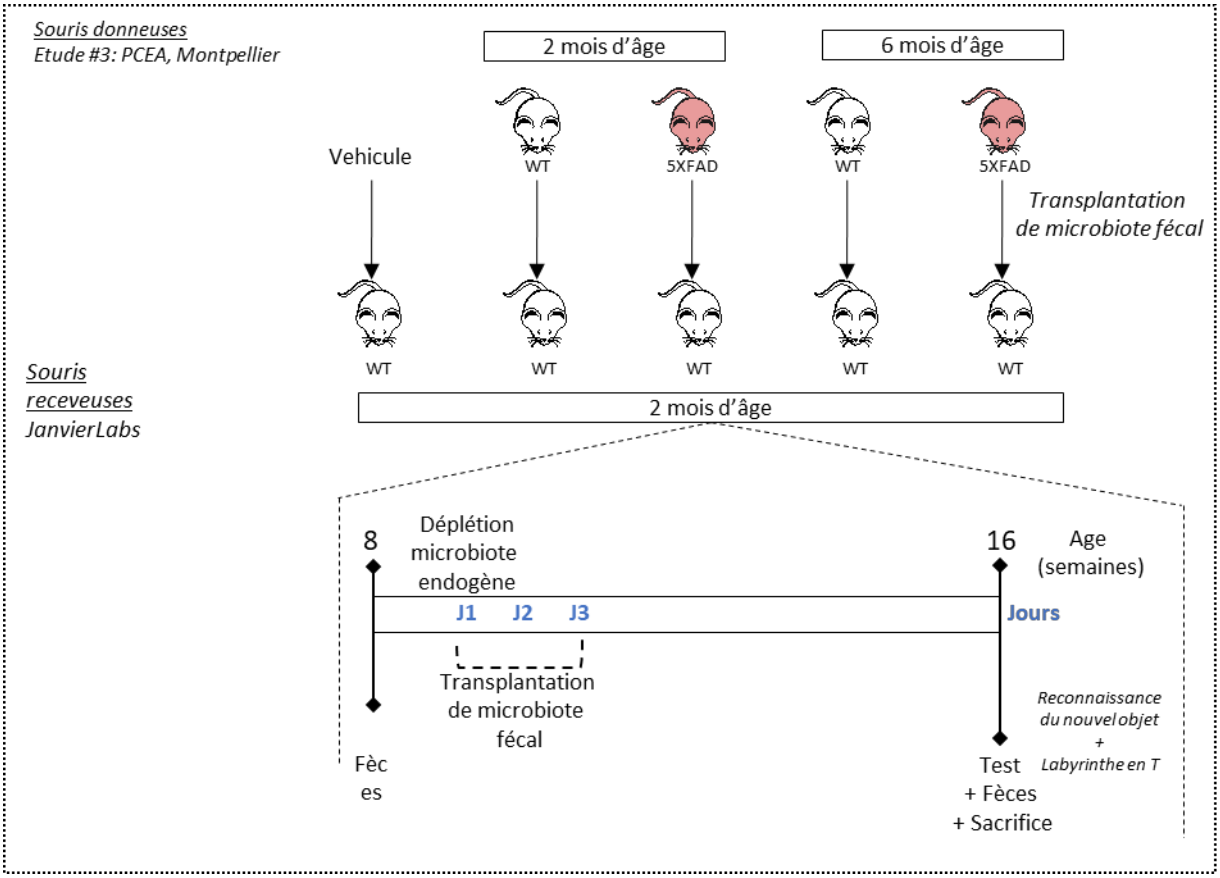


Figure 5 – Schéma expérimental de l'étude #3

Traitement

La préparation de la suspension de microbiote a été adaptée de (Leclercq et al., 2020). Brièvement, des fèces fraiches de souris WT de 8 semaines d'âge ont été récupérées, resuspendues dans une solution stérile contenant de la cystéine-HCl 0,05% et du glycérol 10% dilués dans du PBS (1g de fèces dans 10 mL de solution), homogénéisées par agitation durant 5 minutes, passées dans un tamis cellulaire de 100 µm, puis aliquotées et conservées à -20°C. De plus, suivant le protocole de (T. Le Roy et al., 2019), le microbiote intestinal endogène des souris receveuses a été déplété en amont de la transplantation de microbiote fécal.

Brièvement, après 2 heures de mise à jeun, les souris ont reçu 5 administrations orales espacées de 30 minutes d'un laxatif (Colopeg ® concentré à 6,86 g/100 mL dans de l'eau stérile) puis 200 µL de la suspension de microbiote fécal fraichement décongelée 6 heures après la dernière administration du laxatif. L'administration de 200 µL de la suspension de microbiote fécal a été réitérée les deux jours suivants.

Performances cognitives

10 jours post-transplantation, le test de reconnaissance du nouvel objet a été réalisé [Figure-6]. Cependant, le groupe contrôle ayant reçu le véhicule ne permet pas de valider le test. En effet, ce groupe explore autant l'objet familier que l'objet nouveau, ne montrant aucune discrimination des objets. Aucune conclusion ne peut donc être tirée sur les performances cognitives dans ce test. Ce résultat pourrait s'expliquer par un stress des animaux au moment de la réalisation du test comportemental (déménagement de l'animalerie).

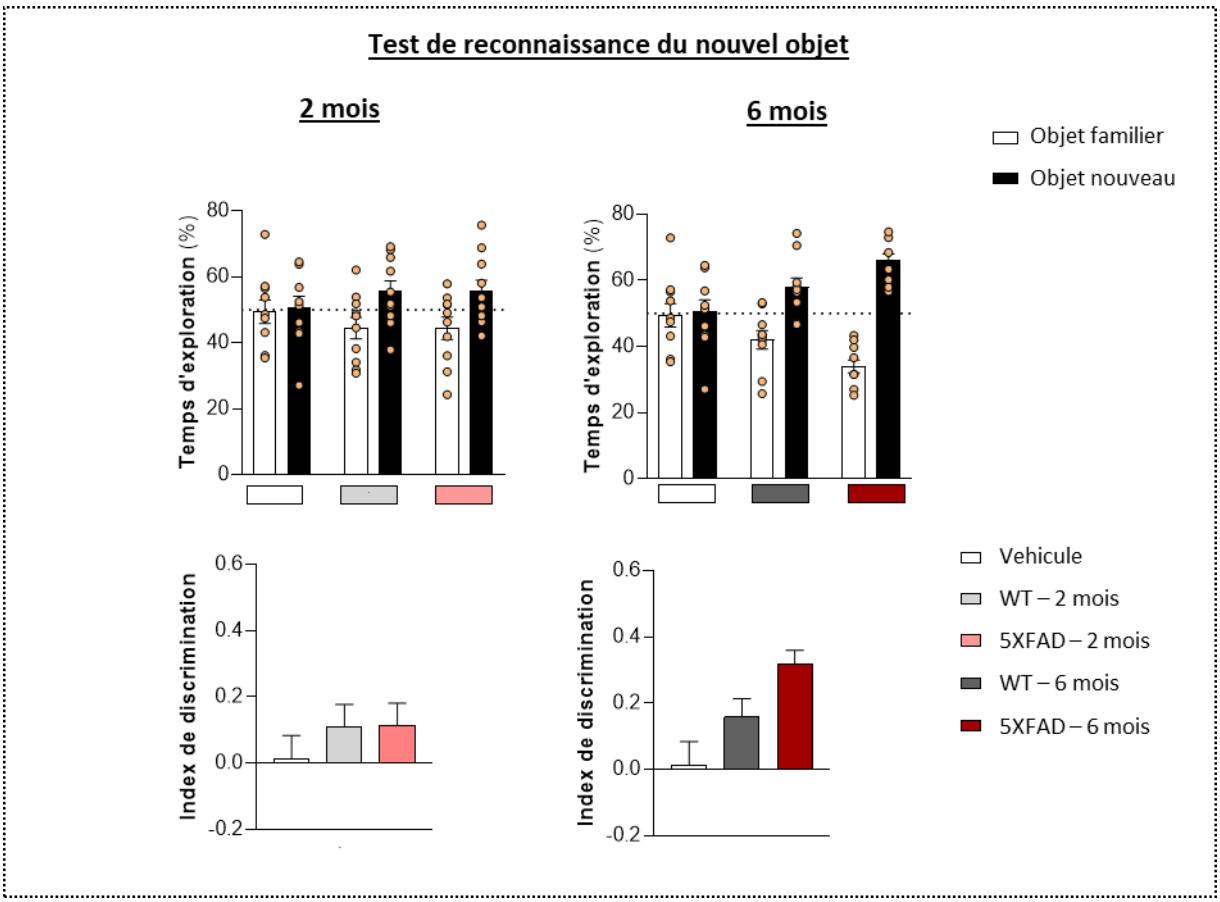


Figure 6 – Test de reconnaissance du nouvel objet de l'étude #3

Analyse du temps d'exploration de l'objet familier et de l'objet nouveau exprimée en % du temps total d'exploration (la ligne correspond à 50% de temps d'exploration) et analyse de l'index de discrimination.
n = 10 par groupe.

Concernant le test du labyrinthe en T [Figure 7], les index de discrimination également non-significatifs pour le groupe contrôle ne permettent pas de tirer de conclusion sur les performances mnésiques des souris ayant reçu des transplantations de microbiote pour les paramètres des temps passés dans les bras et en mouvement dans le bras familier et nouveau. Cependant, si l'on analyse la distance parcourue dans chaque bras, le groupe contrôle parcoure significativement plus de distance dans le bras nouveau que le bras familier comme en témoigne l'index de discrimination significativement différent de 0. Pour ce paramètre, on retrouve des résultats identiques à l'étude précédente. A savoir que la transplantation de microbiote provenant de souris WT entraîne un déficit, à l'inverse du microbiote provenant de souris 5XFAD qui n'induit pas d'altération.

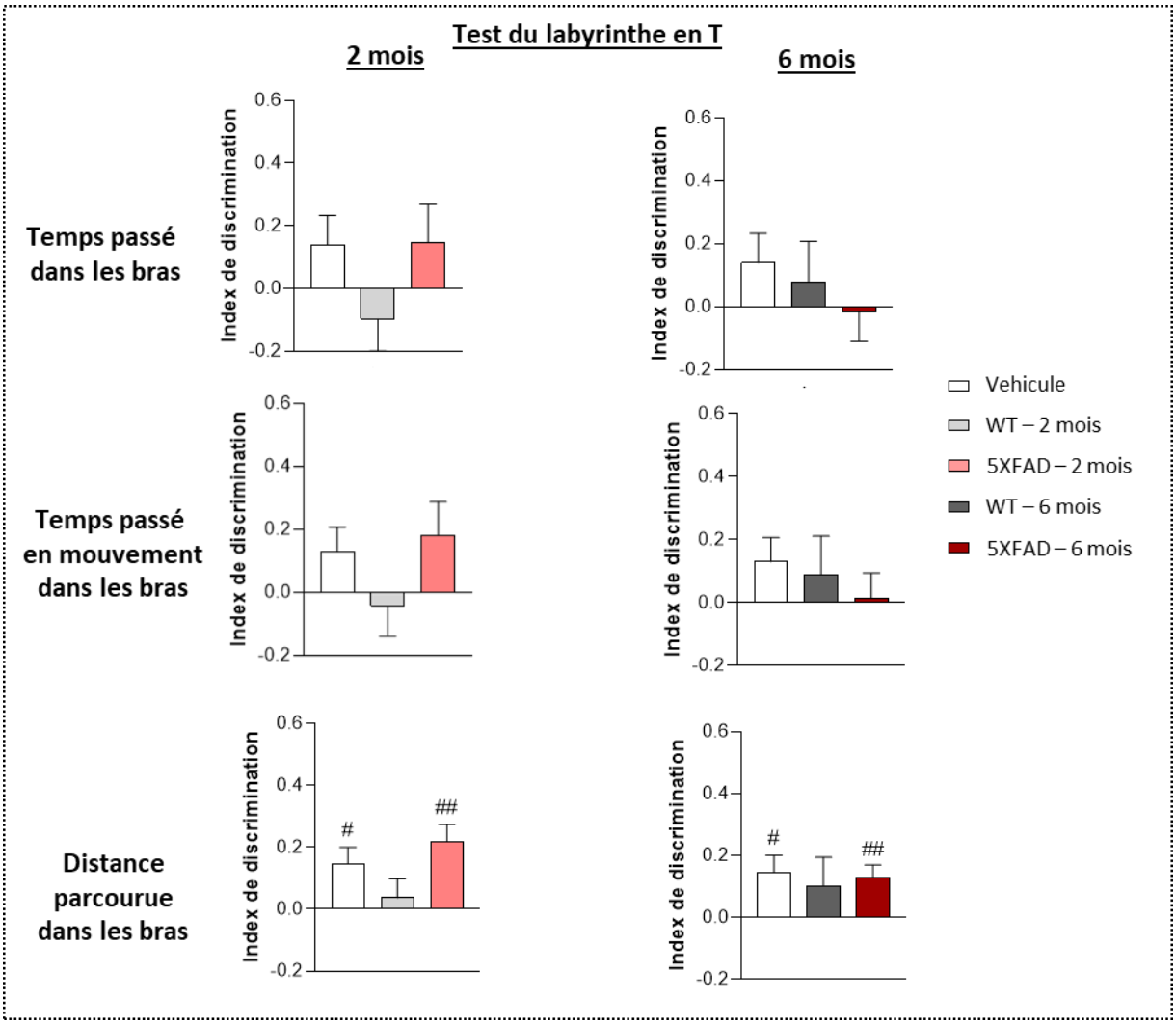


Figure 7 – Test du labyrinthe en T de l'étude #3

Index de discrimination des analyses du temps passé, du temps passé en mouvement et de la distance parcourue dans le bras familier et le bras nouveau exprimée n = 10 par groupe., # p < 0,05 (one sample t-test par rapport à 0)

En résumé, dans des conditions de statut sanitaire conventionnel et sous fond C57BL/6SJL, la transplantation de microbiote fécal provenant de souris WT de 6 mois d'âge, et de souris 5XFAD de 2 et 6 mois d'âge, induit une altération des performances mnésiques des souris WT receveuses (étude #1). Dans des conditions de statut sanitaire SOPF et sous fond C57BL/6, cette transplantation de microbiote fécal provenant de souris WT de 2 ou 6 mois d'âge altère les performances mnésiques des souris receveuse, contrairement au microbiote fécal provenant de souris 5XFAD (étude #2 et #3). Il est intéressant de noter que, pour les études #2 et #3, dans lesquelles les souris donneuses proviennent de la même animalerie SOPF, ce sont les mêmes groupes expérimentaux de souris qui développent des altérations de la cognition malgré les changements de procédés de préparation et de transplantation du microbiote intestinal. Cela soulève donc l'importance du statut sanitaire de l'animalerie dans laquelle les lignées sont maintenues. En effet, comme expliqué précédemment, en animalerie conventionnelle nous observons la présence de bactéries, parasites et virus qui sont absents des animalerie SOPF [Figure S1]. Le microbiote intestinal plus diversifié en animalerie conventionnelle, et les preuves de concept démontrant que le microbiote est un acteur clé dans le développement des pathologies neurologiques, peuvent expliquer les altérations des performances cognitives lorsque le microbiote intestinal dysbiotique de souris 5XFAD est transplanté à des souris saines. De même, il est important de noter que, dans des conditions sanitaires SOPF, nous avons observé que la dysbiose intestinale présente dans le modèle 5XFAD en comparaison à des souris saines, pour un même âge, est moins prononcée qu'en environnement conventionnel, et en parallèle le changement de fond génétique peut également entraîner une modification de la composition du microbiote intestinal [Figure 8].

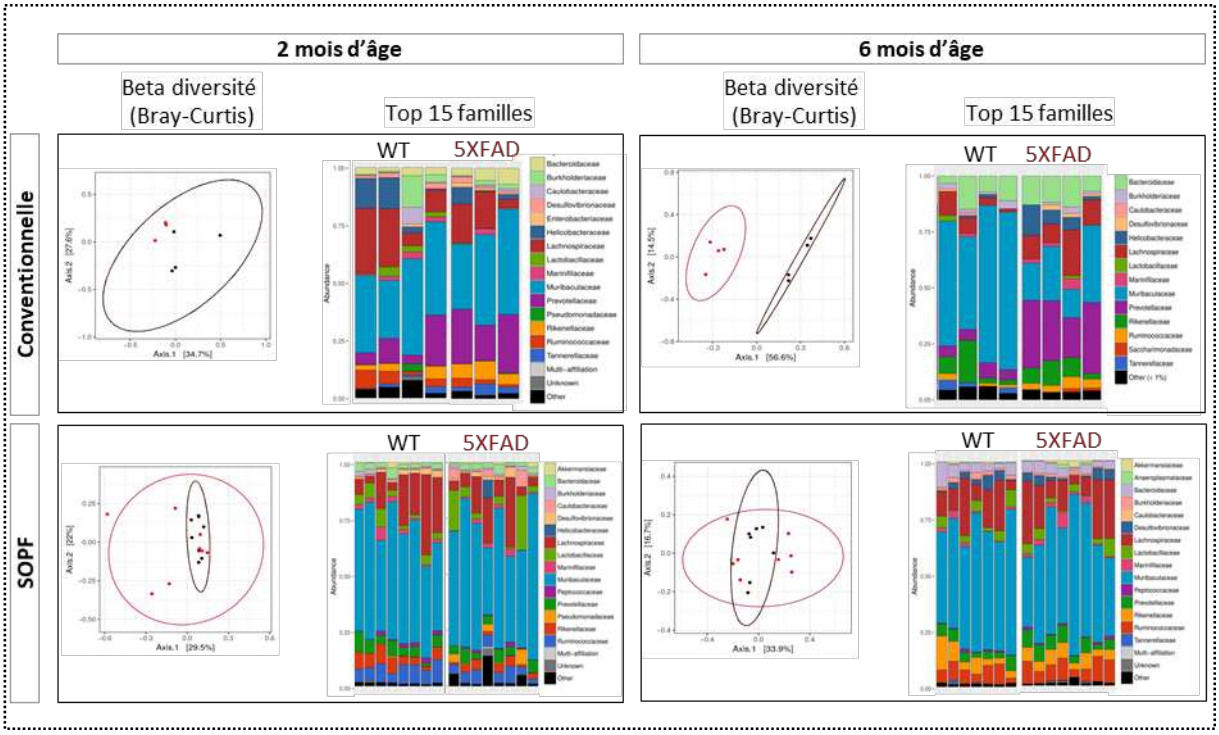


Figure 8 – Analyse de la dysbiose du microbiote intestinal chez les souris 5XFAD

Analyse de la bêta-diversité et de l'abondance bactérienne du top 15 des familles chez les souris WT et 5XFAD à 2 mois d'âge et 6 mois d'âge, en environnement conventionnel (C57BL/6SJL) et SOPF (C57BL/6).
SOPF: Specific and Opportunist Pathogen-Free

Étude de la restauration du microbiote intestinal de souris 5XFAD

La présence d'un microbiote intestinal dysbiotique dans le modèle 5XFAD par comparaison à des souris saines et notre étude #1 démontrant que ce microbiote est en capacité d'induire des altérations mnésiques lorsqu'on le transplante à des souris saines, suggèrent la possibilité de ralentir le développement de la pathologie des souris 5XFAD par transplantation de microbiote provenant de souris saines.

Etude #4

Schéma de l'étude

En 2016, dans une étude préliminaire menée au cours de mon master 1, l'équipe a administré par voie orale deux fois par semaine, soit une solution contrôle, soit du microbiote intestinal provenant de souris WT âgées de 8 semaines, à des souris 5XFAD receveuses âgées de 7 semaines. En parallèle, les performances de mémoire des souris 5XFAD receveuses ont été évaluées longitudinalement avec le test de reconnaissance du nouvel objet après 7, 10 et 13 semaines de traitement [Figure 9].

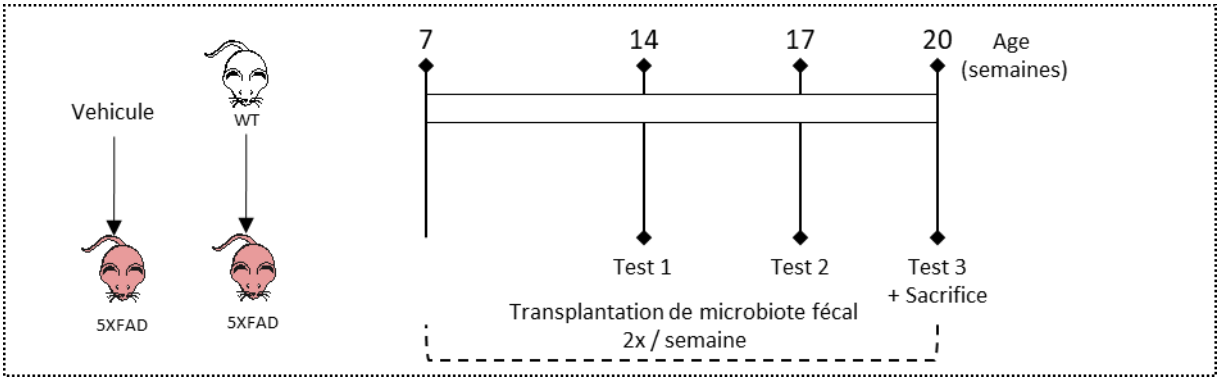


Figure 9 – Schéma expérimental de l'étude #4

Test 1-3 : test de reconnaissance du nouvel objet.

Animaux et traitements

Les souris receveuses 5XFAD de fond C57BL/6SJL utilisées pour cette étude provenaient de l'animalerie conventionnelle Fac. Nord de Marseille et les souris WT donneuses de l'animalerie Janvier Lab.

Pour la préparation du microbiote des souris WT, après anesthésie irréversible, le contenu du colon a été suspendu dans du PBS stérile, centrifugé 2 mn à 800 g à 4°C puis aliquoté et conservé à -20°C. Au moment du traitement, un aliquot a été dégelé et dilué au 1/10 dans du PBS stérile, puis 100 µL de solution a été administrée à chaque souris. Les souris contrôles ont reçu en parallèle 100 µL de PBS stérile.

Performances cognitives

Après 7, 10 et 13 semaines de traitement, un test de reconnaissance du nouvel objet a été réalisé afin d'évaluer l'impact de la transplantation d'un microbiote sain sur les performances cognitives des souris 5XFAD [Figure 10].

Après 7 semaines de traitement, à l'âge de 14 semaines (Test 1), aucun des deux groupes de souris 5XFAD ne présente de déficits cognitifs dans ce test comme en témoigne la différence significative de temps d'exploration entre l'objet familier et l'objet nouveau. A l'âge de 17 semaines (Test 2), les déficits cognitifs sont présents mais sont moins prononcés dans le groupe ayant reçu du microbiote intestinal de souris saines : 50% de temps d'exploration pour l'objet familier et nouveau dans le groupe contrôle, contre respectivement 41% et 59% d'exploration pour l'objet familier et nouveau dans le groupe traité. Cependant, à 20 semaines d'âge (Test 3), les deux groupes présentent des déficits cognitifs prononcés.

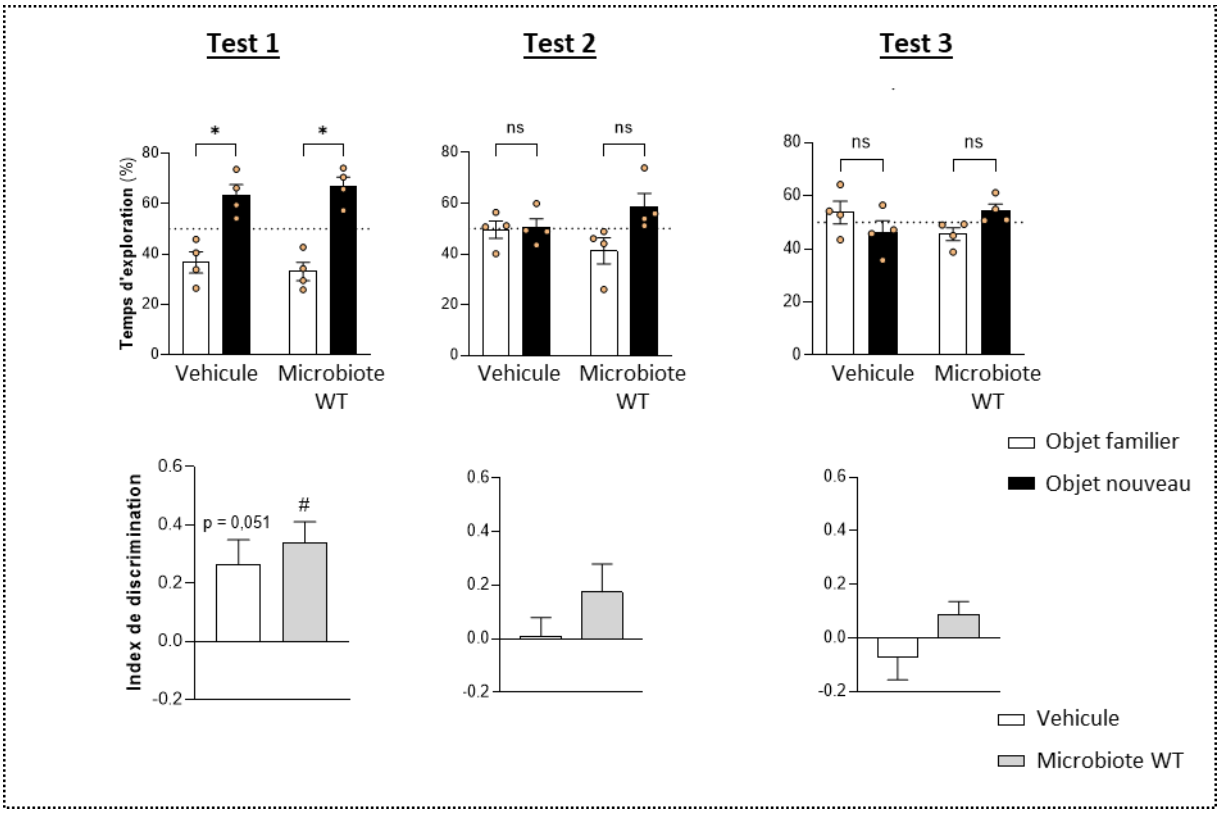


Figure 10 – Test de reconnaissance du nouvel objet de l'étude #4

Analyse du temps d'exploration de l'objet familier et de l'objet nouveau exprimée en % du temps total d'exploration (la ligne correspond à 50% de temps d'exploration) et analyse de l'index de discrimination.
*n = 4 par groupes. *p < 0,05 (two-way ANOVA), # p < 0,05 (one sample t-test par rapport à 0)*

En résumé, cette étude préliminaire (4 souris par groupes) a montré que l'administration d'un microbiote intestinal provenant de souris saines à des souris 5XFAD, tend à ralentir le développement des altérations de mémoire dans le test de reconnaissance du nouvel objet.

Etude #5

L'étude #4 a donc été réitérée avec un plus grand nombre d'animaux et en incluant la récupération des cerveaux en fin d'expérience afin d'élargir les analyses sur la pathologie cérébrale, mais également la récupération des fèces des souris receveuses 5XFAD avant et après traitement afin d'analyser l'impact d'un tel traitement sur le microbiote intestinal.

Il faut cependant noter que, comme expliqué précédemment, des évènements indépendants de notre volonté nous ont conduits à redériver et à héberger la lignée 5XFAD au PCEA de Montpellier, animalerie de statut sanitaire SOPF. La lignée a également été croisée afin de passer sur un fond C57BL/6 pur. De même, tenant compte des évolutions de la littérature dans le domaine, des modifications dans le protocole de préparation des suspensions du microbiote et dans le procédé d'administration ont été implémentées.

Schéma de l'étude

Le paradigme expérimental [Figure 11] a consisté en une déplétion du microbiote endogène des souris receveuses 5XFAD C57BL/6, âgées de 6 mois, une implémentation par trois administrations orales du microbiote fécal provenant de souris WT âgées de 2 mois et à l'évaluation de leurs performances cognitives 10 jours post-transplantation. Les évaluations cognitives comprenaient : le test de reconnaissance du nouvel objet pour évaluer la mémoire épisodique et le test du labyrinthe en T pour évaluer la mémoire spatiale. L'étude comprenait deux groupes contrôles : un groupe de souris 5XFAD ayant reçu une solution véhicule, et un groupe de souris WT ayant reçu la même transplantation de microbiote fécal WT. Par ailleurs, un prélèvement fécal a été effectué avant la déplétion du microbiote endogène et en fin d'expérience.

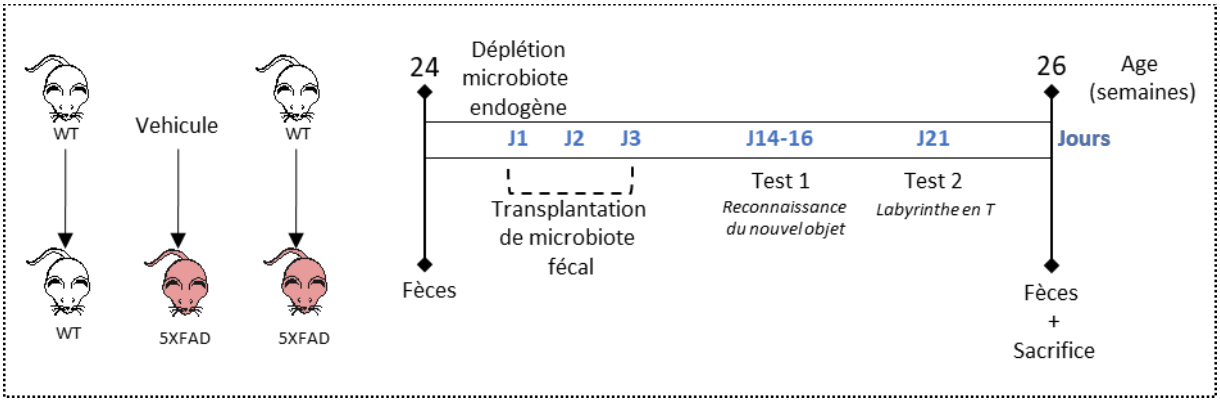


Figure 11 – Schéma expérimental de l'étude #5

Animaux et traitements

Les souris donneuses WT et receveuses 5XFAD C57BL/6 proviennent du PCEA de Montpellier. La préparation de la suspension de microbiote a été adaptée de (Leclercq et al., 2020). Brièvement, des fèces fraiches de souris WT de 8 semaines d'âge ont été récupérées, suspendues dans une solution stérile contenant de la cystéine-HCl 0,05% et du glycérol 10%, dilués dans du PBS (1g de fèces dans 10mL de solution), homogénéisées par agitation durant 5 minutes, passées dans un tamis cellulaire de 100µm, puis aliquotées et conservées à -20°C. Les souris receveuses 5XFAD ont été traitées à un âge où elles présentent des altérations de la mémoire. Des expériences de comportement montrant que les souris 5XFAD provenant du PCEA présentent des déficits cognitifs dans le test de reconnaissance du nouvel objet à 6 mois d'âge (*Partie 3 de la section Résultats*), cet âge a été choisi pour la réalisation des expériences. Suivant les études de (T. Le Roy et al., 2019), le microbiote intestinal endogène a été déplété en amont de la transplantation de microbiote fécal. Brièvement, après 2 heures de mise à jeun, les souris ont reçu 5 administrations orales espacées de 30 minutes d'un laxatif (Colopeg ® concentré à 13,72 g/100 mL dans de l'eau stérile) puis 200 µL de la suspension de microbiote fécal fraichement dégelée 6 heures après la dernière administration du laxatif, avec renouvellement de l'administration de 200 µL de la suspension de microbiote fécal fraichement dégelée les deux jours suivants.

Performances cognitives

10 jours post-transplantation, un test de reconnaissance du nouvel objet a été réalisé [Figure 12A]. Cependant, le groupe contrôle WT ne permet pas de valider le test. En effet, comme en témoigne l'index de discrimination négatif, ce groupe explore d'avantage l'objet familier que l'objet nouveau. Aucune conclusion ne peut donc être tirée sur les performances cognitives dans ce test du groupe 5XFAD ayant reçu un microbiote provenant de souris WT.

Concernant le test du labyrinthe en T [Figure 12B], le groupe contrôle ne permet à nouveau pas de valider le test car quel que soit le paramètre analysé, aucun index de discrimination n'apparait significativement différent de zéro. Cependant, il y a une tendance à ce que ce groupe WT explore d'avantage le bras nouveau, et le groupe contrôle 5XFAD, connu pour avoir des altérations cognitives à cet âge, présente effectivement un déficit mnésique marqué.

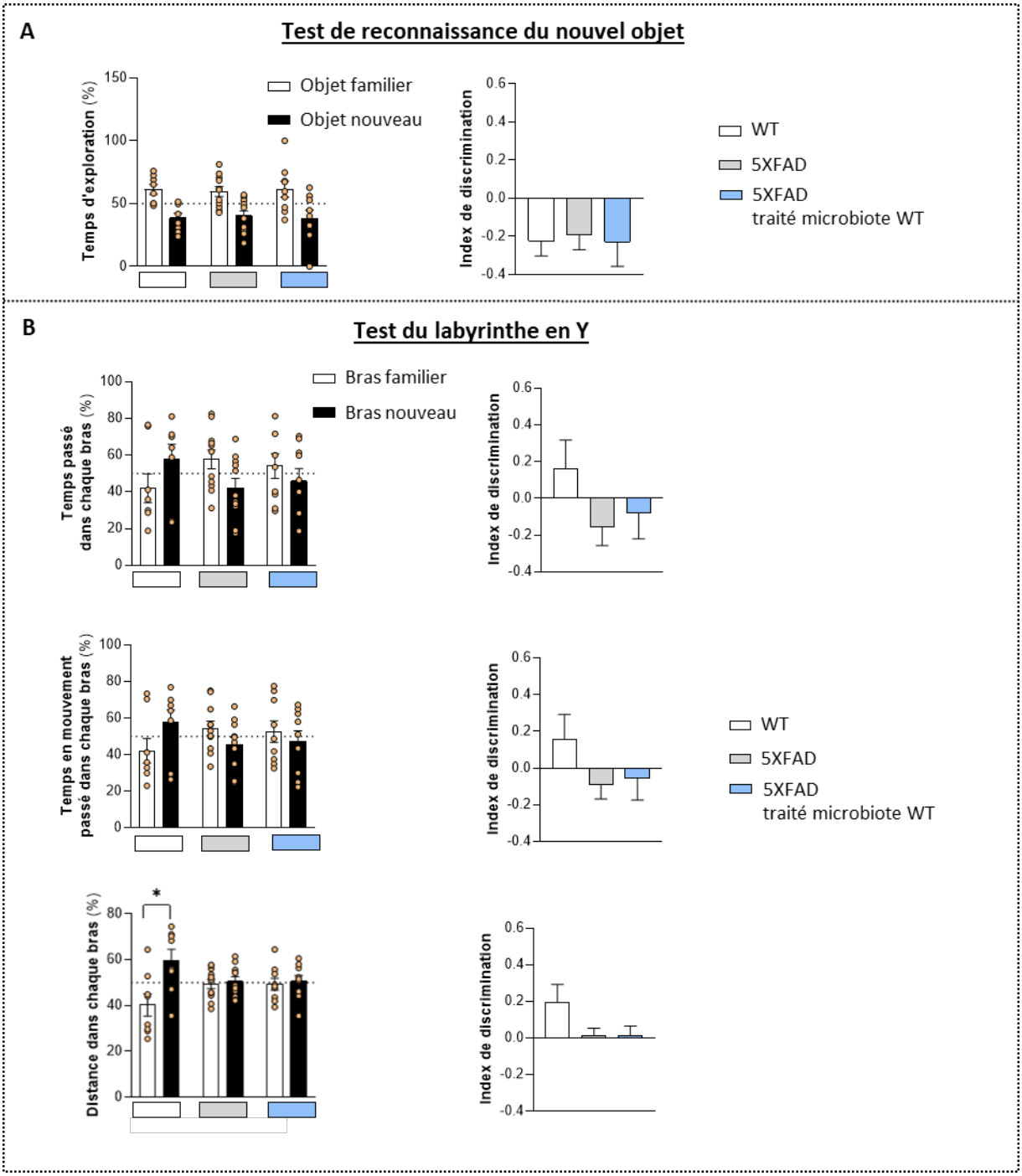


Figure 12 – Tests de mémoire de l'étude #5

Analyse du temps d'exploration de l'objet familier et de l'objet nouveau exprimée en % (la ligne correspond à 50%) avec l'analyse de l'index de discrimination (A) et analyse du temps passé, du temps passé en mouvement et de la distance parcourue dans le bras familier et le bras nouveau exprimée en % (la ligne correspond à 50%) avec les index de discrimination correspondant (B).

*n = 8-11 par groupes. * p < 0,05 (two-way ANOVA), # p < 0,05 (one sample t-test par rapport à 0)*

Pathologie cérébrale et microbiote intestinal

Malgré l'absence de résultats pour les performances cognitives, l'analyse de la pathologie cérébrale des souris 5XFAD, notamment de l'amyloïdogénèse et de la neuroinflammation, permettront d'évaluer si dans ce paradigme expérimental, la transplantation de microbiote fécal provenant de souris WT est en capacité de moduler certaines caractéristiques de la pathologie. En effet, très récemment, le Dr. D. Holsinger et S. Elangovan, ont démontré dans ce même modèle murin, qu'une transplantation chez des souris 5XFAD âgées de 36 semaines avec du microbiote provenant de souris saines âgées de 8 semaines est en capacité de diminuer la pathologie amyloïde (Holsinger & Elangovan, 2020).

De même, l'analyse métagénomique bactérienne des prélèvements fécaux permettra d'évaluer dans quelle mesure une telle transplantation est en capacité de moduler la composition bactérienne du microbiote intestinal.

Statut sanitaire

Bactéries
Helicobacter hepaticus
Helicobacter rodentium
Helicobacter typhlonius
Mycoplasma pulmonis
Pasteurella pneumotropica
Staphylococcus aureus
Virus
Virus de l'hépatite murin
Norovirus murin
Parasites
Myobia musculi
Syphacia obvelata
Tritrichomonas

Figure supplémentaire 1 – Micro-organismes présents uniquement en animalerie conventionnelle
D'après le rapport 14-5438 datant de décembre 2014 du contrôle sanitaire de l'animalerie Fac. Nord effectué par les laboratoires Harlan.

Etude	Statut sanitaire	Fond génétique	Etude de la causalité utilisant du microbiote intestinal de souris 5XFAD					
			Souris receveuses	WT	WT	WT	WT	WT
			Administration	Véhicule	Microbiote WT 2 mois	Microbiote 5XFAD 2 mois	Microbiote WT 6 mois	Microbiote 5XFAD 6 mois
#1	CONV	C57BL/6SJL	Test de l'objet nouveau	✓	✓	×	×	×
#2	SOPF	C57BL/6	Test de l'objet nouveau	✓	×	✓	×	✓
#3	SOPF	C57BL/6	Test de l'objet nouveau	Test non-validé				
			Test du labyrinthe en T	✓	×	✓	×	✓
Etude	**Statut sanitaire**	**Fond génétique**	**Etude de la restauration du microbiote intestinal de souris 5XFAD**					
#4	CONV	C57BL/6SJL	Souris receveuses	/	5XFAD	5XFAD		
			Administration		Véhicule	Microbiote WT 2 mois		
			Test de l'objet nouveau	Déficit cognitif moins prononcé dans le groupe traité				
#5	SOPF	C57BL/6	Souris receveuses	WT	5XFAD	5XFAD		
			Administration	Microbiote WT 2 mois	Véhicule	Microbiote WT 2 mois		
			Test de l'objet nouveau	Test non-validé				
			Test du labyrinthe en T	✓	Aucun ralentissement du déclin cognitif observé dans le groupe traité			

Résumé des résultats obtenus suite à la modulation du microbiote intestinal par transplantation fécale

CONV : conventionnel. SOPF : Specific and Opportunistic Pathogen-Free. Test de l'objet nouveau : test de reconnaissance du nouvel objet. Le test du labyrinthe en T correspond aux analyses de la distance parcourue dans chaque bras. Symbole ✓ : non-déficitaire. Symbole × : déficit cognitif.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

La maladie d'Alzheimer (MA) reste à ce jour sans traitement curatif et fait l'objet d'une recherche active visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, le microbiote intestinal devient particulièrement attractif en raison de la découverte de son rôle clé dans le développement et la progression de pathologies neurologiques, dont la MA. En effet, de nombreuses études modulant le microbiote intestinal de modèles murins de la MA par administration de modulateurs microbien tels que les antibiotiques, les prébiotiques et les probiotiques, ou par un élevage en condition axénique, ont démontré une modulation des atteintes cognitives et neuronales de la pathologie.

Concernant les modèles axéniques, de nombreuses études sur des modèles murins de la MA ont montré qu'en absence de germes, un ralentissement du développement de la pathologie amyloïde et microgliale est observé dans le cerveau. Cependant, il est nécessaire de prendre en compte que l'absence de microorganismes ne se cantonne pas seulement au niveau intestinal mais à l'ensemble de l'organisme. Il faut donc être vigilant quant aux associations entre le microbiote intestinal et les observations faites au niveau cérébral dans ces modèles animaux. En effet, des études sur modèles murins et en clinique humaine ont démontré que plusieurs populations microbiennes de l'organisme humain jouent un rôle dans le développement de la MA. Nous pouvons citer le microbiote buccal avec l'espèce bactérienne *Porphyromonas gingivalis* (Dominy et al., 2019; Pritchard et al., 2017), et le microbiote respiratoire avec l'espèce bactérienne *Chlamydia pneumoniae* (Gérard et al., 2006), la présence de ces bactéries ayant été corrélée avec la MA. De même, l'analyse *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de la MA a permis de suggérer l'existence d'un microbiote cérébral qui pourrait également jouer un rôle clé dans la pathologie. Les modèles axéniques de la MA étant exempts de tout microbiote, il est possible que l'absence du microbiote intestinal ne soit pas seule responsable de la modulation de la pathologie. Par ailleurs, les études du Dr. R. Heijtz ont mis en avant l'importance de la présence d'un microbiote intestinal lors du développement fœtal et néonatal, qui a un impact prépondérant dans le développement cérébral et les fonctions cognitives à l'âge adulte (Heijtz, 2016; Heijtz et al., 2011). Les modèles de souris axénique, au développement cérébral perturbé, ne semblent donc pas de bons modèles pour étudier les atteintes cognitives.

La caractérisation du microbiote bactérien intestinal par des analyses métagénomiques en modèles murins ou chez l'Homme a permis de mettre en évidence la présence d'une dysbiose intestinale dans le cadre de la MA. La modulation directe du microbiote intestinal de modèles murins non-axéniques par des modulateurs microbiens classiques ou par transplantation de microbiote fécal permet une évaluation de l'impact de ce microbiote intestinal dans le développement de la pathologie qui semble plus pertinente qu'une étude en modèle axénique.

Les traitements antibiotiques ont ainsi largement été utilisés et ont permis de démontrer que la déplétion partielle ou presque totale du microbiote intestinal, engendrée par des cocktails d'antibiotiques à large spectre, ralentit le développement de la pathologie dans divers modèles murins de la MA (Dodiya et al., 2019; Guilherme et al., 2021; Harach et al., 2017; Minter et al., 2017, 2016). De même, l'utilisation de prébiotiques ou de probiotiques présente des effets bénéfiques sur les caractéristiques cognitives et neuropathologiques dans ces modèles précliniques. Cependant, dans cette thèse, nous avons démontré qu'un traitement chronique avec un cocktail antibiotique n'engendre aucune modulation de la pathologie amyloïde de souris femelles 5XFAD. Le Dr. S. Sisodia ayant fait le même constat sur des souris femelles APP/PS1-21 (Dodiya et al., 2019), et les études précédemment citées ayant toutes été réalisées chez des mâles, ces données démontrent donc une différence d'efficacité des traitements antibiotiques en fonction du sexe des animaux. De nombreuses études ont rapporté, aussi bien chez le rongeur qu'en clinique humaine, des différences notables de la composition du microbiote intestinal entre mâles/hommes et femelles/femmes. Au niveau translationnel, il serait donc intéressant d'adapter les traitements visant à moduler le microbiote intestinal selon le sexe du patient. Un parallèle peut être établi avec les études sur les mécanismes de la douleur qui sont sexe-dépendants et ont mené au développement de traitements sexe-spécifiques (Bartley & Fillingim, 2013).

Nous avons également démontré au cours de cette étude de modulation par antibiothérapie, l'importance du régime alimentaire. En effet, le traitement antibiotique, qui est sans effet sur la pathologie amyloïde des souris femelles 5XFAD sous régime alimentaire normal, devient très efficace pour diminuer l'amyloïdose lorsque les souris sont soumises à un régime alimentaire riche en graisse. Cet effet du régime riche en graisse peut être corrélé à la modulation du microbiote intestinal qui montre une augmentation drastique du phylum

Firmicutes, de la famille *Streptococcaceae* et du genre *Lactoccocus*. Dans cette même étude, l'administration chronique d'un prébiotique capable de diminuer la pathologie amyloïde sous régime alimentaire standard, perd son efficacité lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse. Cela démontre donc, que tout comme le sexe du patient, la prise en compte du régime alimentaire est nécessaire dans le cadre de traitements visant à moduler le microbiote intestinal, car un même traitement n'aura pas la même efficacité selon le régime alimentaire du sujet traité.

La transplantation de microbiote fécal est connue pour son efficacité dans le traitement des infections récurrentes à *Clostridium difficile*. Cette thérapie a plus récemment été étudiée dans des essais cliniques pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn ou les colites ulcéreuses (Cammarota et al., 2014; Levy & Allegretti, 2019), et également pour le traitement des maladies du cerveau. En effet, les patients atteints de troubles neurologiques, tels que les troubles du spectre autistique, de la maladie de Parkinson ou de la MA, présentent une composition altérée du microbiote intestinal par comparaison à des sujets contrôles. La transplantation de microbiote fécal provenant de sujets contrôles a démontré son efficacité dans l'amélioration des symptômes de patients autistes ou parkinsoniens (Huang et al., 2019; Kang et al., 2017b, 2019b). Une étude de cas isolée a également été rapportée pour un patient atteint de MA dont la transplantation fécale, pour indication d'infection à *C. difficile,* a restauré de façon notable les facultés cognitives (Hazan, 2020).
Ayant démontré par des analyses préalables au sein de l'équipe la présence d'une dysbiose intestinale dans le modèle 5XFAD, nous avons, au cours de cette thèse, évalué la possibilité de ralentir le développement de la pathologie de ce modèle en implantant un microbiote intestinal non-dysbiotique provenant de souris saines. Nos données préliminaires sur un faible nombre de souris ont montré qu'un tel traitement tend à ralentir l'apparition des déficits mnésiques. Malheureusement, la seconde expérience réalisée avec un plus grand nombre d'animaux ne nous permet pas de tirer de conclusion sur la restauration des performances cognitives suite à la transplantation de microbiote fécal sain. Cependant, le Dr. D. Holsinger et S. Elangovan ont démontré dans ce même modèle murin, qu'une transplantation, chez des souris 5XFAD âgées de 9 mois, de microbiote intestinal provenant de souris saines plus jeunes (2 mois) est en capacité de diminuer la pathologie amyloïde et de ralentir le développement des déficits mnésiques (Holsinger & Elangovan, 2020). De même, dans le modèle APP/PS1, des

souris transgéniques de 6 mois ayant reçu une transplantation fécale issue d'animaux WT du même âge présentent une diminution globale des déficits cognitifs, de l'accumulation d'Aβ, des altérations synaptiques et de la neuroinflammation (Sun et al., 2019). Ces études démontrent ainsi l'intérêt thérapeutique que peut présenter une transplantation de microbiote fécal pour des pathologies neurologiques présentant une dysbiose intestinale. Cette technique soulève cependant de nombreuses questions concernant la méthodologie de transplantation. En effet, l'utilisation d'un prétraitement antibiotique pour dépléter le microbiote intestinal endogène et optimiser l'implantation du microbiote donneur est controversée. Une étude démontre que lors d'une transplantation fécale, le microbiote intestinal entre groupes receveurs/donneurs présente plus de similarité en absence de prétraitement antibiotique (Manichanh et al., 2010). Le prétraitement antibiotique peut ainsi être sans effet sur la richesse et la diversité bactérienne après transplantation, ou augmenter la diversité bactérienne (Freitag et al., 2019; S. K. Ji et al., 2017). Par ailleurs, de tels traitements vont favoriser le développement de bactéries multi-résistantes. Pour dépléter le microbiote endogène, une alternative aux antibiotiques repose sur l'utilisation de laxatifs en amont de la transplantation. L'efficacité du PEG 3500/Colopeg® a été démontrée dans une étude menée par le Dr. K. Clément, par comparaison à l'utilisation d'antibiotiques (T. Le Roy et al., 2019).

Nous avons également effectué une étude visant à déterminer la causalité du microbiote dysbiotique de souris 5XFAD à contribuer au développement d'altérations cognitives. Étant donné que la dysbiose évolue avec le vieillissement, nous avons effectué des transplantations du microbiote fécal de 5XFAD âgées de 2 ou 6 mois d'âge à des souris saines. Nos données préalables nous ont permis de montrer que le microbiote intestinal provenant de souris 5XFAD élevées en animalerie conventionnelle altère les performances mnésiques des souris saines, démontrant sa causalité dans le développement des altérations cognitives. Cependant, après une redérivation de notre lignée en animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques et opportunistes, et un changement de fond génétique de C57BL/6SJL au fond C57BL/6J, cet effet néfaste sur la cognition des souris receveuses est perdu. La dysbiose du microbiote intestinal des souris 5XFAD présente toujours une altération en comparaison à des souris saines mais celle-ci est nettement moins prononcée. En parallèle, un retard d'environ deux mois est observé dans le développement de la pathologie, d'une part en raison du changement de fond génétique, et d'autre part en raison du changement de statut sanitaire.

Notre étude soulève donc l'importance des conditions d'hébergement des modèles animaux dans le cadre des études sur le microbiote et de la prise en compte du fond génétique. En effet, le microbiote correspond de manière générale à l'ensemble des microorganismes d'un environnement donné, comprenant donc bactéries, virus, parasites et champignons. L'ensemble de ces microorganismes jouent un rôle dans la MA. Certains acteurs microbiens étant autorisés en animalerie conventionnelle (le genre *Helicobacter* par exemple qui a épidémiologiquement été associé à la MA (Beydoun et al., 2018)), les modèles animaux qui sont hébergés en statut conventionnel apparaissent, de ce fait, plus adaptés à l'étude du lien entre le microbiote et la MA. Des études ont également démontré que le fond génétique joue un rôle dans la composition du microbiote intestinal (Ahn et al., 2020; Ericsson et al., 2015; Safari et al., 2020) et qu'il est donc à prendre en considération dans les études de modulation du microbiote.

Les souris humanisées, animaux transplantés avec du microbiote humain, constituent des modèles particulièrement prometteurs. En effet, l'étude sur le microbiote murin permet d'obtenir de nombreuses preuves de concept liant son implication dans le développement de la pathologie, ou dans l'efficacité de divers prébiotiques et probiotiques. Cependant, afin de développer des thérapies efficaces, il est intéressant de travailler avec le microbiote intestinal de personnes atteintes de la MA. Dans ce contexte, une collaboration entre le Dr. S. Claeysen de notre équipe et des cliniciens du CHU de Montpellier (projet MICMALZ, étude clinique NCT04841135), a pour objectif de caractériser le microbiote intestinal de patients atteints de la MA, et de l'administrer par transplantation à des souris saines ou 5XFAD afin d'évaluer l'impact de ce microbiote humain dysbiotique sur les fonctions cognitives ; étude que j'ai contribué à mettre en place.

Toujours dans le cadre de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'équipe a également, en collaboration avec l'équipe de chimistes du Pr. P. Dallemagne (Université de Caen), développé des composés capables d'agir simultanément sur plusieurs cibles. Dans ce contexte, le consortium a conçu une molécule nommée la donécopirdine qui est à la fois inhibitrice de l'acétylcholinestérase, agoniste du récepteur 5-HT_4 et antagoniste du récepteur 5-HT_6. La donécopirdine cible ainsi trois cibles présentant un intérêt thérapeutique pour la MA. Nous avons démontré dans le modèle 5XFAD qu'un traitement préventif ou curatif avec

cette molécule présente de meilleures capacités à ralentir le déclin cognitif et la pathologie que le donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase actuellement sur le marché. La donécopirdine présente des effets aussi bien au niveau de la pathologie cérébrale que de la pathologie intestinale dans le modèle 5XFAD. En effet, nous avons démontré d'une part que ce composé permet une diminution de la neuroinflammation et de la pathologie amyloïde, mais engendre également une modulation du microbiote intestinal avec une restauration de certaines abondances bactériennes.

Les études de cette thèse se sont concentrées sur le modèle murin d'amyloïdose 5XFAD en raison des premières données de la littérature démontrant un lien entre le microbiote intestinal et la pathologie amyloïde. La pathologie Tau constitue également une caractéristique essentielle de la MA qu'il ne faut pas négliger. Les effets de la composition du microbiote intestinal sur la phosphorylation de Tau et son agrégation dans le contexte de la MA sont également à étudier. Les études du Dr. J. Sun montrent une diminution de la phosphorylation de Tau dans le modèle d'amyloïdose APP/PS1 après transplantation fécale de microbiote sain (Sun et al., 2019). Des études similaires seraient à réaliser dans des modèles présentant une pathologie Tau.

En résumé, les résultats de ce travail de thèse ont permis de démontrer que la composition bactérienne du microbiote intestinal joue un rôle dans le développement de la pathophysiologie du modèle murin 5XFAD. Des modulations de ce microbiote par des modulateurs microbiens classiques ou par transplantation fécale modifient les performances mnésiques et la pathologie amyloïde, mais le sexe et le régime alimentaire des sujets sont à prendre en considération. Les résultats de cette étude confirment l'intérêt de l'axe microbiote intestinal-cerveau dans les maladies du cerveau et plus particulièrement dans la MA. Face à l'hétérogénéité de cette pathologie, des stratégies thérapeutiques destinées à restaurer le microbiote intestinal des patients atteints de la MA pourraient être développées en combinaison de traitements médicamenteux, tels que des composés multi-cibles innovants.

ANNEXES

PUBLICATIONS

Ismeurt C., Giannoni P., & Claeysen S. (2020). The 5×FAD mouse model of Alzheimer's disease. Diagnosis and Management in Dementia, 207–221. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815854-8.00013-6

(Ismeurt et al., 2020)

Ismeurt C.*, Hatat B.*, Lanthier C., Davis A., Lecoutey C., Baranger K., Freret T., Marin P., Rivera S., Lelouvier B., Boulouard M., Rochais C., Dallemagne P.$^{\$}$, Claeysen S.$^{\$}$.

Donecopirdine, a multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent cognitive and pathological impairments in 5XFAD mice: complete evaluation including metabolome and microbiome characterization.

En préparation

COMMUNICATIONS ORALES

8ème conférence internationale GDR3545-GPCR 2019

« A novel multi-target-directed ligand with triple activity alleviates Alzheimer's disease pathology *in vivo* »

9-11 Octobre 2019 – Montpellier – FR

La Journée des Neurosciences de Montpellier

« Three is better than one: donecopirdine alleviates Alzheimer's disease pathology *in vivo* »

29 Novembre 2019 – Montferrier sur Lez – FR

Les journées « CBS2 DAYS 2021 »

« The impact of gut microbiota in Alzheimer's disease »

26-27 Mai 2021 – Montpellier – FR

Cours dans le cadre de l'unité d'enseignement du Master SDV parcours PPI (EPHE-PSL), intitulée « Physiologie générale et cellulaire » dispensés par l'EPHE

« Microbiota and brain »

07 Février 2020 – Montpellier – FR
12 Février 2021 – Montpellier - FR

POSTERS

Jounée du Club Alzheimer de Montpellier

« Chronic transplantation of dysbiotic gut microbiota from Alzheimer mice and impact on cognition. » **Caroline Ismeurt**, Patrizia Giannoni, Rémy Burcelin, Hilmar Schmidtke, Bérengère Coupé, Thierry Pillot et Sylvie Claeysen.

20-21 Novembre 2018 – Montpellier - FR

«Alzheimer's disease and gut microbiota: from dysbiosis evidence to interventional studies. » **Caroline Ismeurt**, Bérengère Coupé, Patrizia Giannoni, Rémy Burcelin, Hilmar Schmidtke, Thierry Pillot, Benjamin Lelouvier et Sylvie Claeysen.

27 Novembre 2019 – Montpellier - FR

« La donécopirdine : une molécule multi-cible prometteuse pour la maladie d'Alzheimer. » **Caroline Ismeurt**.

17-18 Novembre 2020 – Montpellier - FR

8ème conférence internationale GDR3545-GPCR

«A novel multi-target-directed ligand with triple activity alleviates Alzheimer's disease pathology in vivo. » **Caroline Ismeurt**, Bérénice Hatat , Cédric Lecoutey, Audrey Davis, Thomas Fretet, Michel Boulouard , Christophe Rochais , Patrick Dallemagne and Sylvie Claeysen

9-11 Octobre 2019 – Montpellier – FR



Congrès international Gastronauts Global 2021

« Sex, antibiotics and amyloid connection in Alzheimer's disease: diet also matters. » **Caroline Ismeurt**, Patrizia Giannoni, Gaëlle Payros, Bérengère Coupé, Florence Gaven, Joël Bockaert, Florence Servant, Rémy Burcelin, Benjamin Lelouvier, Sylvie Claeysen

11-13 Mai 2021 – Webinar



Congrès international des NeuroFrance 2021

« Amyloid pathology and sex-dependent effect of antibiotics: diet matters. » **Caroline Ismeurt**, Patrizia Giannoni, Gaëlle Payros, Bérengère Coupé, Florence Gaven, Joël Bockaert, Florence Servant, Rémy Burcelin, Benjamin Lelouvier, Sylvie Claeysen

19-21 Mai 2021 – Webinar



8ème congrès international du Consortium du Microbiote Humain 2021 (IHMC)

« Sex-specific action of antibiotics on amyloid pathology in an Alzheimer mouse model: diet matters. » **Caroline Ismeurt**, Patrizia Giannoni, Gaëlle Payros, Bérengère Coupé, Florence Gaven, Joël Bockaert, Florence Servant, Rémy Burcelin, Benjamin Lelouvier, Sylvie Claeysen

27-29 Juin – Webinar

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, *6*(237). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599

Ahn, I. S., Lang, J. M., Olson, C. A., Diamante, G., Zhang, G., Ying, Z., Byun, H. R., Cely, I., Ding, J., Cohn, P., Kurtz, I., Gomez-Pinilla, F., Lusis, A. J., Hsiao, E. Y., & Yang, X. (2020). Host Genetic Background and Gut Microbiota Contribute to Differential Metabolic Responses to Fructose Consumption in Mice. *The Journal of Nutrition*, *150*(10), 2716–2728. https://doi.org/10.1093/JN/NXAA239

Aisen, Gauthier, Ferris, Saumier, Haine, Garceau, Duong, Suhy, Oh, Lau, & Sampalis. (2011). Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Archives of Medical Science : AMS*, *7*(1), 102–111. https://doi.org/10.5114/AOMS.2011.20612

Aisen, P. S., Davis, K. L., Berg, J. D., Schafer, K., Campbell, K., Thomas, R. G., Weiner, M. F., Farlow, M. R., Sano, M., Grundman, M., Thal, L. J., & Study, for the A. D. C. (2000). A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. *Neurology*, *54*(3), 588–588. https://doi.org/10.1212/WNL.54.3.588

Ajit, Woods, Camden, Thebeau, El-Sayed, Greeson, Erb, Petris, Miller, Sun, & Weisman. (2014). Loss of $P2Y_2$ nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *49*(2), 1031–1042. https://doi.org/10.1007/S12035-013-8577-5

Alam, A., & Neish, A. (2018). Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function. In *Tissue Barriers* (Vol. 6, Issue 3). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/21688370.2018.1539595

Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C. P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R. N., Lewis, J. D., Li, H., Thom, S. R., Bushman, F. D., Vinogradov, S. A., & Wu, G. D. (2014). Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, *147*(5), 1055-1063.e8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.020

Aleman, F. D. D., & Valenzano, D. R. (2019). Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathogens*, *15*(7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007727

Ali, M. M., Ghouri, R., Ans, A., Akbar, A., & Toheed, A. (2019). Recommendations for Anti-inflammatory Treatments in Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review of the

Literature. *Cureus*, *11*(5). https://doi.org/10.7759/CUREUS.4620

Allinson, Parkin, Turner, & Hooper. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of Neuroscience Research*, *74*(3), 342–352. https://doi.org/10.1002/JNR.10737

Alonso, Grundke-Iqbal, Barra, & Iqbal. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(1), 298–303. https://doi.org/10.1073/PNAS.94.1.298

Alonso, Pisa, Marina, Morato, Rábano, & Carrasco. (2014). Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *41*(1), 301–311. https://doi.org/10.3233/JAD-132681

Alshammari, M. K., AlKhulaifi, M. M., Al Farraj, D. A., Somily, A. M., & Albarrag, A. M. (2020). Incidence of Clostridium perfringens and its toxin genes in the gut of children with autism spectrum disorder. *Anaerobe*, *61*. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102114

Álvarez-Arellano, L., & Maldonado-Bernal, C. (2014). Helicobacter pylori and neurological diseases: Married by the laws of inflammation. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *5*(4), 400. https://doi.org/10.4291/WJGP.V5.I4.400

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596

Angulo, Casadó, Mallol, Canela, Viñals, Ferrer, Lluis, & Franco. (2003). A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *13*(4), 440–451. https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2003.TB00475.X

Arai, Lee, Messinger, Greenberg, Lowery, & Trojanowski. (1991). Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Annals of Neurology*, *30*(5), 686–693. https://doi.org/10.1002/ANA.410300509

Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2012). Establishment and

development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology*, *79*(3), 763–772. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., … Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174–180. https://doi.org/10.1038/nature09944

Ashrafian, F., Keshavarz Azizi Raftar, S., Shahryari, A., Behrouzi, A., Yaghoubfar, R., Lari, A., Moradi, H. R., Khatami, S., Omrani, M. D., Vaziri, F., Masotti, A., & Siadat, S. D. (2021). Comparative effects of alive and pasteurized Akkermansia muciniphila on normal diet-fed mice. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95738-5

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, *331*(6015), 337–341. https://doi.org/10.1126/science.1198469

Audinat, É., & Arnoux, I. (2014). La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales. *Médecine/Sciences*, *30*(2), 153–159. https://doi.org/10.1051/medsci/20143002012

Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Transcytosis at the blood–brain barrier. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 57, pp. 32–38). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.014

Back, S. A., Luo, N. L., Borenstein, N. S., Levine, J. M., Volpe, J. J., & Kinney, H. C. (2001). Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *Journal of Neuroscience*, *21*(4), 1302–1312. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-04-01302.2001

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723. https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101

Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, *104*(3), 979–984. https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104

Balaratnasingam, S., & Janca, A. (2012). Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 134, Issue 1, pp. 116–124). Pergamon. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.006

Balducci, C., & Forloni, G. (2019). Doxycycline for Alzheimer's Disease: Fighting β-Amyloid Oligomers and Neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00738

Baldwin, K. T., & Eroglu, C. (2017). Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 45, pp. 113–120). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.006

Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, *27*(1), 27–42. https://doi.org/10.1111/ene.14108

Balin, Gérard, Arking, Appelt, Branigan, Abrams, Whittum-Hudson, & Hudson. (1998). Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Medical Microbiology and Immunology*, *187*(1), 23–42. https://doi.org/10.1007/S004300050071

Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J. S., Wing, E. E., Morofuji, Y., Cook, D. G., & Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/S12974-015-0434-1

Banks, W. A., Kastin, A. J., & Broadwell, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. In *NeuroImmunoModulation* (Vol. 2, Issue 4, pp. 241–248). https://doi.org/10.1159/000097202

Baquet, Z. C., Gorski, J. A., & Jones, K. R. (2004). Early Striatal Dendrite Deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neuroscience*, *24*(17), 4250–4258. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004

Bar-On, Millard, C. B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., J. L. Sussman, A., & Silman, I. (2002). Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug

Rivastigmine†,‡. *Biochemistry*, *41*(11), 3555–3564. https://doi.org/10.1021/BI020016X

Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., & Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *57*(11), 1013–1023. https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953539

Barber, R. C. (2012). *The Genetics of Alzheimer's Disease*. *2012*, 14. https://doi.org/10.6064/2012/246210

Barichella, M., Severgnini, M., Cilia, R., Cassani, E., Bolliri, C., Caronni, S., Ferri, V., Cancello, R., Ceccarani, C., Faierman, S., Pinelli, G., Bellis, G., Zecca, L., Cereda, E., Consolandi, C., & Pezzoli, G. (2019). Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Movement Disorders*, *34*(3), 396–405. https://doi.org/10.1002/mds.27581

Barthel, H. (2020). First Tau PET Tracer Approved: Toward Accurate In Vivo Diagnosis of Alzheimer Disease. *Journal of Nuclear Medicine*, *61*(10), 1409–1410. https://doi.org/10.2967/JNUMED.120.252411

Bartley, E. J., & Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, *111*(1), 52. https://doi.org/10.1093/BJA/AET127

Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L. F., White, C. L., Akiyama, H., Caviness, J. N., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., & Walker, D. G. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated α-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica*, *119*(6), 689–702. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0664-3

Beaugerie, L., Sokol, H., Aubé, C., Bardou, M., Beaugerie, L., Cadiot, G., Delchier, J.-C., Dray, X., Ducrotté, P., Durand, F., Faucheron, J.-L., Karoui, M., Lévy, P., Louvet, A., Lucidarme, O., Mallet, V., Mion, F., Portier, G., Saurin, J.-C., … Zoulim, F. (2014). Les fondamentaux de la pathologie digestive. In *CDU-HGE - Editions Elsevier-Masson*.

Beck, K. D., Poweli-Braxton, L., Widmer, H.-R., Valverde, J., & Hefti, F. (1995). Igfl Gene Disruption Results in Reduced Brain Size, CNS Hypomyelination, and Loss of Hippocampal Granule and Striatal Parvalbumin-Containing Neurons. In *Neuron* (Vol. 14).

Becker-Pauly, C., & Pietrzik, C. U. (2016). The Metalloprotease Meprin β Is an Alternative β-Secretase of APP. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*, 159. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2016.00159

Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. In *Cell*

(Vol. 157, Issue 1, pp. 121–141). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011

Bell, S. M., Barnes, K., Clemmens, H., Al-Rafiah, A. R., Al-ofi, E. A., Leech, V., Bandmann, O., Shaw, P. J., Blackburn, D. J., Ferraiuolo, L., & Mortiboys, H. (2018). Ursodeoxycholic Acid Improves Mitochondrial Function and Redistributes Drp1 in Fibroblasts from Patients with Either Sporadic or Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Biology*, *430*(21), 3942. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2018.08.019

Bellono, N. W., Bayrer, J. R., Leitch, D. B., Castro, J., Zhang, C., O'Donnell, T. A., Brierley, S. M., Ingraham, H. A., & Julius, D. (2017). Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell*, *170*(1), 185-198.e16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.034

Bennett, C. F., Krainer, A. R., & Cleveland, D. W. (2019). Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience*, *42*, 385. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-070918-050501

Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., MacRi, J., McCoy, K. D., Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2011). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, *141*(2). https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052

Berer, K., Gerdes, L. A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., Liu, C., Klotz, L., Stauffer, U., Baranzini, S. E., Kümpfel, T., Hohlfeld, R., Krishnamoorthy, G., & Wekerle, H. (2017). Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(40), 10719–10724. https://doi.org/10.1073/pnas.1711233114

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(2), 160–174. https://doi.org/10.1159/000342079

Besnard, Christensen, Brignot, Bernard, Passilly-Degrace, Nicklaus, Barros, P. de, Collet, Lelouvier, Servant, Blasco-Baque, Verges, Lagrost, Feron, & Burcelin. (2018). Obese Subjects With Specific Gustatory Papillae Microbiota and Salivary Cues Display an Impairment to Sense Lipids. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-018-24619-1

Beydoun, Beydoun, Elbejjani, Dore, & Zonderman. (2018). Helicobacter pylori seropositivity and its association with incident all-cause and Alzheimer's disease dementia in large

national surveys. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, *14*(9), 1148–1158. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2018.04.009

Bhattarai, Y., Williams, B. B., Battaglioli, E. J., Whitaker, W. R., Till, L., Grover, M., Linden, D. R., Akiba, Y., Kandimalla, K. K., Zachos, N. C., Kaunitz, J. D., Sonnenburg, J. L., Fischbach, M. A., Farrugia, G., & Kashyap, P. C. (2018). Gut Microbiota-Produced Tryptamine Activates an Epithelial G-Protein-Coupled Receptor to Increase Colonic Secretion. *Cell Host and Microbe*, *23*(6), 775-785.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.004

Bhutta, A. T., Cleves, M. A., Casey, P. H., Cradock, M. M., & Anand, K. J. S. (2002). Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: A meta-analysis. In *Journal of the American Medical Association* (Vol. 288, Issue 6, pp. 728–737). American Medical Association. https://doi.org/10.1001/jama.288.6.728

Bistoletti, M., Caputi, V., Baranzini, N., Marchesi, N., Filpa, V., Marsilio, I., Cerantola, S., Terova, G., Baj, A., Grimaldi, A., Pascale, A., Frigo, G., Crema, F., Giron, M. C., & Giaroni, C. (2019). Antibiotic treatment-induced dysbiosis differently affects BDNF and TrkB expression in the brain and in the gut of juvenile mice. *PLoS ONE*, *14*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212856

Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*, *284*(6), 643–663. https://doi.org/10.1111/JOIM.12816

Boado, Zhang, Wang, & Pardridge. (2009). Engineering and expression of a chimeric transferrin receptor monoclonal antibody for blood-brain barrier delivery in the mouse. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(4), 1251–1258. https://doi.org/10.1002/BIT.22135

Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. In *Neuropathology and Applied Neurobiology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 3–18). Neuropathol Appl Neurobiol. https://doi.org/10.1111/nan.12011

Bodea, L., Eckert, A., Ittner, L. M., Piguet, O., & Götz, J. (2016). Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Neurochemistry*, *138*(Suppl Suppl 1), 71. https://doi.org/10.1111/JNC.13600

Boehme, M., Guzzetta, K. E., Bastiaanssen, T. F. S., van de Wouw, M., Moloney, G. M., Gual-Grau, A., Spichak, S., Olavarría-Ramírez, L., Fitzgerald, P., Morillas, E., Ritz, N. L., Jaggar,

M., Cowan, C. S. M., Crispie, F., Donoso, F., Halitzki, E., Neto, M. C., Sichetti, M., Golubeva, A. V., … Cryan, J. F. (2021). Microbiota from young mice counteracts selective age-associated behavioral deficits. *Nature Aging 2021 1:8*, *1*(8), 666–676. https://doi.org/10.1038/s43587-021-00093-9

Bornstein, J. C. (2012). Serotonin in the gut: What does it do? In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 6, Issue FEB). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00016

Borody, T., Leis, S., Campbell, J., Torres, M., & Nowak, A. (2011). Fecal Microbiota Transplantation (FMT) in Multiple Sclerosis (MS). *American Journal of Gastroenterology*, *106*. https://doi.org/10.14309/00000434-201110002-00942

Bowen, Yu, Koki, Nobutaka, Cheng, & Shokei. (2016). High-Fat-Diet Intake Enhances Cerebral Amyloid Angiopathy and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, Independently of Metabolic Disorders. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, *5*(6). https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003154

Braak, & Braak. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, *165*(SUPPL.165), 3–12. https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.1996.TB05866.X

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9

Bracko, O., Vinarcsik, L., Cruz Hernández, J., Ruiz-Uribe, N., Haft-Javaherian, M., Falkenhain, K., Ramanauskaite, E. M., Ali, M., Mohapatra, A., Swallow, M., Njiru, B., Muse, V., Michelucci, P., Nishimura, N., & Schaffer, C. (2020). High fat diet worsens Alzheimer's disease-related behavioral abnormalities and neuropathology in APP/PS1 mice, but not by synergistically decreasing cerebral blood flow. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65908-y

Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. (2008). Terminology: Nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology*, *1*(1), 31–37. https://doi.org/10.1038/mi.2007.9

Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Guan, N. L., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota

influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, *6*(263), 263ra158. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759

Branton, Ellestad, Maingat, Wheatley, Rud, Warren, Holt, Surette, & Power. (2013). Brain microbial populations in HIV/AIDS: α-proteobacteria predominate independent of host immune status. *PloS One*, *8*(1). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0054673

Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 16050–16055. https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108

Britti, J, R., N, E., & AY, A. (2020). Tau inhibits mitochondrial calcium efflux and makes neurons vulnerable to calcium-induced cell death. *Cell Calcium*, *86*. https://doi.org/10.1016/J.CECA.2019.102150

Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R. (2018). The Physiological Roles of Amyloid-β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(APR), 118. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00118

Brown. (2019). The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 180. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1564-7

Brown, K., Valenta, K., Fisman, D., Simor, A., & Daneman, N. (2015). Hospital ward antibiotic prescribing and the risks of Clostridium difficile infection. *JAMA Internal Medicine*, *175*(4), 626–633. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.8273

Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282

Browning, K. N., & Travagli, R. A. (2014). Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Comprehensive Physiology*, *4*(4), 1339–1368. https://doi.org/10.1002/cphy.c130055

Brun, P., Giron, M. C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A. R., Spagnol, L., De Caro, R., Pizzuti, D., Barbieri, V., Rosato, A., Sturniolo, G. C., Martines, D., Zaninotto, G., Palù, G., & Castagliuolo, I. (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system.

Gastroenterology, *145*(6), 1323–1333. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.047

Buée, Bussière, Buée-Scherrer, Delacourte, & Hof. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *33*(1), 95–130. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9

Bunker, J. J., & Bendelac, A. (2018). IgA Responses to Microbiota. In *Immunity* (Vol. 49, Issue 2, pp. 211–224). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011

Burcelin, Serino, Chabo, Blasco-Baque, & Amar. (2011). Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetologica*, *48*(4), 257–273. https://doi.org/10.1007/S00592-011-0333-6

Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., & Yankner, B. A. (1995). β-Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron*, *14*(4), 879–888. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90232-5

Buser, J. R., Maire, J., Riddle, A., Gong, X., Nguyen, T., Nelson, K., Luo, N. L., Ren, J., Struve, J., Sherman, L. S., Miller, S. P., Chau, V., Hendson, G., Ballabh, P., Grafe, M. R., & Back, S. A. (2012). Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Annals of Neurology*, *71*(1), 93–109. https://doi.org/10.1002/ana.22627

Butterfield, D. A., & Pocernich, C. B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *CNS Drugs*, *17*(9), 641–652. https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004

Cacabelos, R. (2019). How plausible is an Alzheimer's disease vaccine? *Https://Doi.Org/10.1080/17460441.2019.1667329*, *15*(1), 1–6. https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1667329

Cai, T., Shi, X., Yuan, L. Z., Tang, D., & Wang, F. (2019). Fecal microbiota transplantation in an elderly patient with mental depression. In *International Psychogeriatrics* (Vol. 31, Issue 10, pp. 1525–1526). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/S1041610219000115

Cammarota, G., Ianiro, G., & Gasbarrini, A. (2014). Fecal microbiota transplantation for the treatment of clostridium difficile infection: A systematic review. In *Journal of Clinical Gastroenterology*. https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000046

Canet, G., Chevallier, N., Zussy, C., Desrumaux, C., & Givalois, L. (2018). Central Role of Glucocorticoid Receptors in Alzheimer's Disease and Depression. *Frontiers in*

Neuroscience, *12*(OCT), 739. https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00739

Canet, G., Dias, C., Gabelle, A., Simonin, Y., Gosselet, F., Marchi, N., Makinson, A., Tuaillon, E., Perre, P. Van de, Givalois, L., & Salinas, S. (2018). HIV Neuroinfection and Alzheimer's Disease: Similarities and Potential Links? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00307

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., … Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*(7), 1761–1772. https://doi.org/10.2337/db06-1491

Cani, P. D., Hoste, S., Guiot, Y., & Delzenne, N. M. (2007). Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *British Journal of Nutrition*, *98*(1), 32–37. https://doi.org/10.1017/S0007114507691648

Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., De Backer, F., Neyrinck, A. M., & Delzenne, N. M. (2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(5), 1236–1243. https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28095

Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., & Delzenne, N. M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, *50*(11), 2374–2383. https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0

Cani, P. D., Possemiers, S., Wiele, T. Van de, Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., & Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, *58*(8), 1091–1103. https://doi.org/10.1136/GUT.2008.165886

Cano, Posner, Moline, Hurt, Swartz, Hsu, & Hobart. (2010). The ADAS-cog in Alzheimer's disease clinical trials: psychometric evaluation of the sum and its parts. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *81*(12), 1363–1368. https://doi.org/10.1136/JNNP.2009.204008

Cantarel, B. L., Waubant, E., Chehoud, C., Kuczynski, J., Desantis, T. Z., Warrington, J., Venkatesan, A., Fraser, C. M., & Mowry, E. M. (2015). Gut microbiota in multiple sclerosis: Possible influence of immunomodulators. *Journal of Investigative Medicine*, *63*(5), 729–734. https://doi.org/10.1097/JIM.0000000000000192

Carter, C. J. (2017). Genetic, Transcriptome, Proteomic, and Epidemiological Evidence for Blood-Brain Barrier Disruption and Polymicrobial Brain Invasion as Determinant Factors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, *1*(1), 125. https://doi.org/10.3233/ADR-170017

Cattaneo, Cattane, Galluzzi, Provasi, Lopizzo, Festari, Ferrari, Guerra, Paghera, Muscio, Bianchetti, Volta, Turla, Cotelli, Gennuso, Prelle, Zanetti, Lussignoli, Mirabile, … Frisoni. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of Aging*, *49*, 60–68. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2016.08.019

Caulfield. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, *58*(3), 319–379. https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90027-B

Cekanaviciute, E., Yoo, B. B., Runia, T. F., Debelius, J. W., Singh, S., Nelson, C. A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y. K., Hauser, S. L., Crabtree-Hartman, E., Sand, I. K., Gacias, M., Zhu, Y., Casaccia, P., Cree, B. A. C., Knight, R., Mazmanian, S. K., & Baranzini, S. E. (2017). Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(40), 10713–10718. https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114

Cenini, G., & Voos, W. (2019). Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(JULY). https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00902

Cerejeira, J., Lagarto, L., & Mukaetova-Ladinska, E. B. (2012). Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. *Frontiers in Neurology*, *3*. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2012.00073

Cerf-Bensussan, N., & Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 10, pp. 735–744). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nri2850

Chapman, Bing-Canar, Alosco, Steinberg, Martin, Kowall, Tripodis, & Stern. (2016). Mini Mental State Examination and Logical Memory scores for entry into Alzheimer's disease trials. *Alzheimer's Research & Therapy*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/S13195-016-0176-Z

Chappell, A. S., Gonzales, C., Williams, J., Witte, M. M., Mohs, R. C., & Sperling, R. (2007). AMPA potentiator treatment of cognitive deficits in Alzheimer disease. *Neurology*, *68*(13), 1008–1012. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000260240.46070.7C

Chassaing, Koren, Goodrich, Poole, Srinivasan, Ley, & Gewirtz. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, *519*(7541), 92–96. https://doi.org/10.1038/NATURE14232

Chasseigneaux, S., & Allinquant, B. (2012). Functions of Aβ, sAPPα and sAPPβ : similarities and differences. *Journal of Neurochemistry*, *120*(SUPPL. 1), 99–108. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07584.X

Chatterjee, Cassel, Schneider-Anthony, Merienne, Cosquer, Tzeplaeff, Sinha, H., Kumar, Chaturbedy, Eswaramoorthy, Gras, L., Keime, Bousiges, Dutar, Petsophonsakul, Rampon, Cassel, Buée, Blum, … Boutillier. (2018). Reinstating plasticity and memory in a tauopathy mouse model with an acetyltransferase activator. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(11). https://doi.org/10.15252/EMMM.201708587

Chen, B., Chen, H., Shu, X., Yin, Y., Li, J., Qin, J., Chen, L., Peng, K., Xu, F., Gu, W., Zhao, H., Jiang, L., Li, L., Song, J., Elitsur, Y., Yu, H. D., Jiang, M., Wang, X., & Xiang, C. (2018). Presence of segmented filamentous bacteria in human children and its potential role in the modulation of human gut immunity. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01403

Chen, Fang, Chen, Zhou, Fan, Lin, Li, Xu, Chen, Ma, & Chen. (2020). Gut Microbiome Alterations Precede Cerebral Amyloidosis and Microglial Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/8456596

Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Soldan, M. M. P., Luckey, D. H., Marietta, E. V., Jeraldo, P. R., Chen, X., Weinshenker, B. G., Rodriguez, M., Kantarci, O. H., Nelson, H., Murray, J. A., & Mangalam, A. K. (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep28484

Chen, Q., Ma, H., Guo, X., Liu, J., Gui, T., & Gai, Z. (2019). Farnesoid X Receptor (FXR)

Aggravates Amyloid-β-Triggered Apoptosis by Modulating the cAMP-Response Element-Binding Protein (CREB)/Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Pathway In Vitro. *Medical Science Monitor*, *25*, 9335–9345. https://doi.org/10.12659/MSM.920065

Chen, S. G., Stribinskis, V., Rane, M. J., Demuth, D. R., Gozal, E., Roberts, A. M., Jagadapillai, R., Liu, R., Choe, K., Shivakumar, B., Son, F., Jin, S., Kerber, R., Adame, A., Masliah, E., & Friedland, R. P. (2016). Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and Caenorhabditis elegans. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/SREP34477

Cheng, Y., & Bai, F. (2018). The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(MAR), 163. https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00163

Chesselet, M. F., Richter, F., Zhu, C., Magen, I., Watson, M. B., & Subramaniam, S. R. (2012). A Progressive Mouse Model of Parkinson's Disease: The Thy1-aSyn ("Line 61") Mice. In *Neurotherapeutics* (Vol. 9, Issue 2, pp. 297–314). Springer. https://doi.org/10.1007/s13311-012-0104-2

Cheung, S. G., Goldenthal, A. R., Uhlemann, A. C., Mann, J. J., Miller, J. M., & Sublette, M. E. (2019). Systematic review of gut microbiota and major depression. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 10, Issue FEB). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00034

Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Kozarov, E., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2015). Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response. *Frontiers in Microbiology*, *0*(JUN), 671. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00671

Choi, Park, Na, Han, Kim, Shim, & Lee. (2011). Tolerability and efficacy of memantine add-on therapy to rivastigmine transdermal patches in mild to moderate Alzheimer's disease: a multicenter, randomized, open-label, parallel-group study. *Current Medical Research and Opinion*, *27*(7), 1375–1383. https://doi.org/10.1185/03007995.2011.582484

Chow, A. K., & Gulbransen, B. D. (2017). Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *312*(2), G145–G152. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00384.2016

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*,

18(6), 666–673. https://doi.org/10.1038/mp.2012.77

Clevers, H. C., & Bevins, C. L. (2013). Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology*, *75*(1), 289–311. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744

Cochet, Donneger, Cassier, Gaven, Lichtenthaler, Marin, Bockaert, Dumuis, & Claeysen. (2013a). 5-HT4 receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10. *ACS Chemical Neuroscience*, *4*(1), 130–140. https://doi.org/10.1021/CN300095T

Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., Dumuis, A., & Claeysen, S. (2013b). 5-HT4 receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10. *ACS Chemical Neuroscience*, *4*(1), 130–140. https://doi.org/10.1021/cn300095t

Colizzi, C. (2019). The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions*, *5*, 184. https://doi.org/10.1016/J.TRCI.2018.09.002

Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep23129

Colom-Cadena, M., Spires-Jones, T., Zetterberg, H., Blennow, K., Caggiano, A., DeKosky, S. T., Fillit, H., Harrison, J. E., Schneider, L. S., Scheltens, P., Haan, W. de, Grundman, M., Dyck, C. H. van, Izzo, N. J., & Catalano, S. M. (2020). The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy 2020 12:1*, *12*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S13195-020-00588-4

Companys-Alemany, Turcu, Bellver-Sanchis, Loza, Brea, Canudas, Leiva, Vázquez, Pallàs, & Griñán-Ferré. (2020). A Novel NMDA Receptor Antagonist Protects against Cognitive Decline Presented by Senescent Mice. *Pharmaceutics*, *12*(3). https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12030284

Consolo, Arnaboldi, Giorgi, Russi, & Ladinsky. (1994). 5-HT4 receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. *Neuroreport*, *5*(10), 1230–1232. https://doi.org/10.1097/00001756-199406020-00018

Coomans, Schoonhoven, Tuncel, Verfaillie, Wolters, Boellaard, Ossenkoppele, Braber, Scheper, Schober, Sweeney, Ryan, Schuit, Windhorst, Barkhof, Scheltens, Golla,

Hillebrand, Gouw, & Berckel, V. (2021). In vivo tau pathology is associated with synaptic loss and altered synaptic function. *Alzheimer's Research & Therapy*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S13195-021-00772-0

Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. In *Clinical and Translational Immunology* (Vol. 5, Issue 4, p. e73). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1038/cti.2016.17

Costa, M., Brookes, S. J. H., & Hennig, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, *47*(SUPPL. 4), iv15–iv19. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15

Costantini, T. W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G. A., Putnam, J. G., Hageny, A. M., Lopez, N., Eliceiri, B. P., Bansal, V., & Coimbra, R. (2012). Targeting α-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in the Enteric Nervous System: A Cholinergic Agonist Prevents Gut Barrier Failure after Severe Burn Injury. *The American Journal of Pathology*, *181*(2), 478–486. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2012.04.005

Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. In *Life Sciences* (Vol. 195). https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.025

Cryan, O'Riordan, Cowan, Sandhu, Bastiaanssen, Boehme, Codagnone, Cussotto, Fulling, Golubeva, Guzzetta, Jaggar, Long-Smith, Lyte, Martin, Molinero-Perez, Moloney, Morelli, Morillas, … Dinan. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877–2013. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00018.2018

Cullen, N. C., Leuzy, A., Janelidze, S., Palmqvist, S., Svenningsson, A. L., Stomrud, E., Dage, J. L., Mattsson-Carlgren, N., & Hansson, O. (2021). Plasma biomarkers of Alzheimer's disease improve prediction of cognitive decline in cognitively unimpaired elderly populations. *Nature Communications 2021 12:1*, *12*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23746-0

Cummings, J., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., & Taghva, K. (2021). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions*, *7*(1). https://doi.org/10.1002/TRC2.12179

Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A., & Kelliher, M. A. (2005). Rip1 mediates the trif-dependent Toll-like receptor 3- and 4-induced NF-κB activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *Journal of Biological*

Chemistry, *280*(44), 36560–36566. https://doi.org/10.1074/jbc.M506831200

Dahl, C., Stigum, H., Valeur, J., Iszatt, N., Lenters, V., Peddada, S., Bjørnholt, J. V., Midtvedt, T., Mandal, S., & Eggesbø, M. (2018). Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. *International Journal of Epidemiology*, *47*(5), 1658–1669. https://doi.org/10.1093/ije/dyy064

Dam, R. M. van, Willett, W. C., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2002). Dietary Fat and Meat Intake in Relation to Risk of Type 2 Diabetes in Men. *Diabetes Care*, *25*(3), 417–424. https://doi.org/10.2337/DIACARE.25.3.417

De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D. I., Cristofori, F., Guerzoni, M. E., Gobbetti, M., & Francavilla, R. (2013). Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. *PLoS ONE*, *8*(10), 76993. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076993

De la Rosa, A., Olaso-Gonzalez, G., Arc-Chagnaud, C., Millan, F., Salvador-Pascual, A., García-Lucerga, C., Blasco-Lafarga, C., Garcia-Dominguez, E., Carretero, A., Correas, A. G., Viña, J., & Gomez-Cabrera, M. C. (2020). Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Sport and Health Science*, *9*(5), 394–404. https://doi.org/10.1016/J.JSHS.2020.01.004

Deardorff, & GT, G. (2016). A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 3267–3279. https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463

Dehhaghi, M., Kazemi Shariat Panahi, H., & Guillemin, G. J. (2019). Microorganisms, Tryptophan Metabolism, and Kynurenine Pathway: A Complex Interconnected Loop Influencing Human Health Status. In *International Journal of Tryptophan Research* (Vol. 12). SAGE Publications Ltd. https://doi.org/10.1177/1178646919852996

Delacourte, Sergeant, Wattez, Maurage, Lebert, Pasquier, & David. (2002). Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Experimental Gerontology*, *37*(10–11), 1291–1296. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00141-9

Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 54, Issue 9, pp. 2325–

2340). American Society for Biochemistry and Molecular Biology. https://doi.org/10.1194/jlr.R036012

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, *170*(4), 1179–1188. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005

Diaz-Aparicio, I., Paris, I., Sierra-Torre, V., Plaza-Zabala, A., Rodríguez-Iglesias, N., Márquez-Ropero, M., Beccari, S., Huguet, P., Abiega, O., Alberdi, E., Matute, C., Bernales, I., Schulz, A., Otrokocsi, L., Sperlagh, B., Happonen, K. E., Lemke, G., Maletic-Savatic, M., Valero, J., & Sierra, A. (2020). Microglia actively remodel adult hippocampal neurogenesis through the phagocytosis secretome. *Journal of Neuroscience*, *40*(7), 1453–1482. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0993-19.2019

Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. In *Biological Psychiatry* (Vol. 74, Issue 10, pp. 720–726). Biol Psychiatry. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001

Dinleyici, E. C., Eren, M., Ozen, M., Yargic, Z. A., & Vandenplas, Y. (2012). Effectiveness and safety of Saccharomyces boulardii for acute infectious diarrhea. In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 12, Issue 4, pp. 395–410). https://doi.org/10.1517/14712598.2012.664129

Dodiya, H. B., Kuntz, T., Shaik, S. M., Baufeld, C., Leibowitz, J., Zhang, X., Gottel, N., Zhang, X., Butovsky, O., Gilbert, J. A., & Sisodia, S. S. (2019). Sex-specific effects of microbiome perturbations on cerebral Aβ amyloidosis and microglia phenotypes. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(7), 1542–1560. https://doi.org/10.1084/JEM.20182386

Dolan, P. J., & Johnson, G. V. (2010). The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, *13*(5), 595. /pmc/articles/PMC2941661/

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(26), 11971–11975. https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107

Dominy, Lynch, Ermini, Benedyk, Marczyk, Konradi, Nguyen, Haditsch, Raha, Griffin, Holsinger, Arastu-Kapur, Kaba, Lee, Ryder, Potempa, Mydel, Hellvard, Adamowicz, … Potempa. (2019). Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease

causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, *5*(1). https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAU3333

Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, *30*(4), 379. https://doi.org/10.1038/APS.2009.24

Dormoy, V., & Massfelder, T. (2013). La métabolomique au service de la médecine - L'exemple du carcinome rénal. *Médecine/Sciences*, *29*(5), 463–468. https://doi.org/10.1051/medsci/2013295007

Drews, A., Flint, J., Shivji, N., Jönsson, P., Wirthensohn, D., Genst, E. De, Vincke, C., Muyldermans, S., Dobson, C., & Klenerman, D. (2016). Individual aggregates of amyloid beta induce temporary calcium influx through the cell membrane of neuronal cells. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep31910

Du, G., Dong, W., Yang, Q., Yu, X., Ma, J., Gu, W., & Huang, Y. (2021). Altered Gut Microbiota Related to Inflammatory Responses in Patients With Huntington's Disease. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603594

Duce, Tsatsanis, Cater, James, Robb, Wikhe, Leong, Perez, Johanssen, Greenough, Cho, Galatis, Moir, Masters, McLean, Tanzi, Cappai, Barnham, Ciccotosto, … Bush. (2010). Iron-export ferroxidase activity of β-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, *142*(6), 857–867. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.08.014

Dufour, N., & Debarbieux, L. (2017). La phagothérapie - Une arme crédible face à l'antibiorésistance. *Médecine/Sciences*, *33*(4), 410–416. https://doi.org/10.1051/medsci/20173304011

Dugger, Hoffman, Scroggins, Serrano, Adler, Shill, Belden, Sabbagh, Caviness, Dunckley, D., & Beach. (2019). Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neuroscience Letters*, *696*, 132–139. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2018.12.031

Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., & De Cesare, A. (2021). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-021-82726-y

Duyckaerts, C., Potier, M.-C., & Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, *115*(1), 5.

https://doi.org/10.1007/S00401-007-0312-8

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308*(5728), 1635–1638. https://doi.org/10.1126/science.1110591

Egerod, K. L., Petersen, N., Timshel, P. N., Rekling, J. C., Wang, Y., Liu, Q., Schwartz, T. W., & Gautron, L. (2018). Profiling of G protein-coupled receptors in vagal afferents reveals novel gut-to-brain sensing mechanisms. *Molecular Metabolism*, *12*, 62–75. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.03.016

Elphick, D. A., & Mahida, Y. R. (2005). Paneth cells: Their role in innate immunity and inflammatory disease. In *Gut* (Vol. 54, Issue 12, pp. 1802–1809). BMJ Publishing Group. https://doi.org/10.1136/gut.2005.068601

Ericsson, A. C., Davis, J. W., Spollen, W., Bivens, N., Givan, S., Hagan, C. E., McIntosh, M., & Franklin, C. L. (2015). Effects of Vendor and Genetic Background on the Composition of the Fecal Microbiota of Inbred Mice. *PLOS ONE*, *10*(2), e0116704. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0116704

Erny, D., De Angelis, A. L. H., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mahlakoiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., Mccoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 965–977. https://doi.org/10.1038/nn.4030

Esch, Keim, Beattie, Blacher, Culwell, Oltersdorf, McClure, & Ward. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science (New York, N.Y.)*, *248*(4959), 1122–1124. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2111583

Escherich, T. (1989). The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. *Reviews of Infectious Diseases*, *11*(2), 352–356. https://doi.org/10.1093/CLINIDS/11.2.352

Familian, RS, B., P, E., & R, V. (2006). Inhibitory effect of minocycline on amyloid beta fibril formation and human microglial activation. *Glia*, *53*(3), 233–240. https://doi.org/10.1002/GLIA.20268

Farlow, G, A., X, M., & JT, O. (2010). A 25-week, open-label trial investigating rivastigmine transdermal patches with concomitant memantine in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a post hoc analysis. *Current Medical Research and Opinion*, *26*(2), 263–269.

https://doi.org/10.1185/03007990903434914

Faux, Ritchie, Gunn, Rembach, Tsatsanis, Bedo, Harrison, Lannfelt, Blennow, Z., Ingelsson, CL, M., RE, T., JL, C., CM, H., & AI, B. (2010). PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's Disease: additional phase II analyses. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *20*(2), 509–516. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1390

Feng, Y., Huang, Y., Wang, Y., Wang, P., Song, H., & Wang, F. (2019). Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PLoS ONE*, *14*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218384

Fernando, W. M. A. D. B., Martins, I. J., Morici, M., Bharadwaj, P., Rainey-Smith, S. R., Lim, W. L. F., & Martins, R. N. (2020). Sodium Butyrate Reduces Brain Amyloid-β Levels and Improves Cognitive Memory Performance in an Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model at an Early Disease Stage. *Journal of Alzheimer's Disease*, *74*(1), 91–99. https://doi.org/10.3233/JAD-190120

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, *14*(1), 101. https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726

Ferrer, Gomez-Isla, Puig, Freixes, Ribé, Dalfó, & Avila. (2005). Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Current Alzheimer Research*, *2*(1), 3–18. https://doi.org/10.2174/1567205052772713

Ferrer, M., Martínez-Abarca, F., & Golyshin, P. N. (2005). Mining genomes and "metagenomes" for novel catalysts. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 16, Issue 6, pp. 588–593). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.09.001

Fillenbaum, G. G., Kuchibhatla, M. N., Hanlon, J. T., Artz, M. B., Pieper, C. F., Schmader, K. E., Dysken, M. W., & Gray, S. L. (2005). Dementia and Alzheimer's Disease in Community-Dwelling Elders Taking Vitamin C and/or Vitamin E: *Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1345/Aph.1G280*, *39*(12), 2009–2014. https://doi.org/10.1345/APH.1G280

Firth, J., Marx, W., Dash, S., Carney, R., Teasdale, S. B., Solmi, M., Stubbs, B., Schuch, F. B., Carvalho, A. F., Jacka, F., & Sarris, J. (2019). The Effects of Dietary Improvement on Symptoms of Depression and Anxiety: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.

Psychosomatic Medicine, *81*(3), 265–280. https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000673

Formosa-Dague, C., Castelain, M., Martin-Yken, H., Dunker, K., Dague, E., & Sletmoen, M. (2018). The Role of Glycans in Bacterial Adhesion to Mucosal Surfaces: How Can Single-Molecule Techniques Advance Our Understanding? *Microorganisms*, *6*(2), 39. https://doi.org/10.3390/microorganisms6020039

Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., & LaFerla, F. M. (2017). Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends in Neurosciences*, *40*(6), 347–357. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2017.04.002

Francistiová, L., Bianchi, C., Di Lauro, C., Sebastián-Serrano, Á., de Diego-García, L., Kobolák, J., Dinnyés, A., & Díaz-Hernández, M. (2020). The Role of P2X7 Receptor in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *0*, 94. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00094

Fredriksson, Lagerström, Lundin, & Schiöth. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, *63*(6), 1256–1272. https://doi.org/10.1124/MOL.63.6.1256

Freitag, T. L., Hartikainen, A., Jouhten, H., Sahl, C., Meri, S., Anttila, V. J., Mattila, E., Arkkila, P., Jalanka, J., & Satokari, R. (2019). Minor Effect of Antibiotic Pre-treatment on the Engraftment of Donor Microbiota in Fecal Transplantation in Mice. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02685

Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Jr, Scheltens, P., & Thompson, P. M. (2010). The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, *6*(2), 67. https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2009.215

Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. In *Nature Neuroscience* (Vol. 20, Issue 2, pp. 145–155). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nn.4476

Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *81*(1–3), 87–96. https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00127-2

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., … Ohno, H. (2013). Commensal

microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, *504*(7480), 446–450. https://doi.org/10.1038/nature12721

Gaci, N., Borrel, G., Tottey, W., O'Toole, P. W., & Brugère, J.-F. (2014). Archaea and the human gut: New beginning of an old story. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(43), 16062. https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I43.16062

Gacias, M., Gaspari, S., Santos, P. M. G., Tamburini, S., Andrade, M., Zhang, F., Shen, N., Tolstikov, V., Kiebish, M. A., Dupree, J. L., Zachariou, V., Clemente, J. C., & Casaccia, P. (2016). Microbiota-driven transcriptional changes in prefrontal cortex override genetic differences in social behavior. *ELife*, *5*(APRIL2016). https://doi.org/10.7554/eLife.13442

Ganz, T. (2003). Angiogenin: An antimicrobial ribonuclease. In *Nature Immunology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 213–214). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/ni0303-213

Gao, Q., Wang, Y., Wang, X., Fu, S., Zhang, X., Wang, R.-T., & Zhang, X. (2019). Decreased levels of circulating trimethylamine N-oxide alleviate cognitive and pathological deterioration in transgenic mice: a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*, *11*(19), 8642. https://doi.org/10.18632/AGING.102352

Gareau, M. G., Jury, J., MacQueen, G., Sherman, P. M., & Perdue, M. H. (2007). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*, *56*(11), 1522–1528. https://doi.org/10.1136/gut.2006.117176

Gary, Lam, Hérard, Koch, Petit, Gipchtein, Sawiak, Caillierez, Eddarkaoui, Colin, Aujard, Deslys, Brouillet, Buée, Comoy, Pifferi, Picq, & Dhenain. (2019). Encephalopathy induced by Alzheimer brain inoculation in a non-human primate. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 126. https://doi.org/10.1186/S40478-019-0771-X

Gendron, Fertan, Pelletier, Roddick, O'Leary, Anini, & Brown. (2021). Age related weight loss in female 5xFAD mice from 3 to 12 months of age. *Behavioural Brain Research*, *406*. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2021.113214

Gérando, M. de, D'Orange, Augustin, Joséphine, Aurégan, Gaudin-Guérif, Guillermier, Hérard, Stimmer, Petit, Gipchtein, Jan, Escartin, Selingue, Carvalho, Blum, Brouillet, Hantraye, Gaillard, … Cambon. (2021). Neuronal tau species transfer to astrocytes and induce their loss according to tau aggregation state. *Brain : A Journal of Neurology*, *144*(4), 1167–1182. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB011

Gérard, U, D.-W., KS, W., S, D., C, O., BJ, B., WH, F., EZ, B., JA, W.-H., & AP, H. (2006).

Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *48*(3), 355–366. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2006.00154.X

Gerbe, F., Legraverend, C., & Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 69, Issue 17, pp. 2907–2917). Springer. https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7

Gershon, M. D. (1999). *The second brain : a groundbreaking new understanding of nervous disorders of the stomach and intestine*. HarperPerennial.

Gervais, J, P., C, M., P, K., M, Y., M, A., D, L., X, K., A, A., J, L., WA, S., & P, T. (2007). Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiology of Aging*, *28*(4), 537–547. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2006.02.015

Ghaderi, A., Banafshe, H. R., Mirhosseini, N., Moradi, M., Karimi, M. A., Mehrzad, F., Bahmani, F., & Asemi, Z. (2019). Clinical and metabolic response to vitamin D plus probiotic in schizophrenia patients. *BMC Psychiatry*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/s12888-019-2059-x

Ghosh, T. S., Rampelli, S., Jeffery, I. B., Santoro, A., Neto, M., Capri, M., Giampieri, E., Jennings, A., Candela, M., Turroni, S., Zoetendal, E. G., Hermes, G. D. A., Elodie, C., Meunier, N., Brugere, C. M., Pujos-Guillot, E., Berendsen, A. M., Groot, L. C. P. G. M. De, Feskins, E. J. M., … O'Toole, P. W. (2020). Mediterranean diet intervention alters the gut microbiome in older people reducing frailty and improving health status: the NU-AGE 1-year dietary intervention across five European countries. *Gut*, *69*(7), 1218–1228. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2019-319654

Giannoni, Arango-Lievano, ID, N., MC, R., K, B., S, R., F, J., S, C., & N, M. (2016). Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *88*, 107–117. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2016.01.001

Giannoni, F, G., D, de B., K, B., E, M.-G., FS, R., E, V., P, M., J, B., S, R., & S, C. (2013). Early administration of RS 67333, a specific 5-HT4 receptor agonist, prevents amyloidogenesis and behavioral deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *5*(DEC). https://doi.org/10.3389/FNAGI.2013.00096

Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholakh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y., & Chajut, A. (2008).

Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*, *3*(9), e3148. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003148

Giorgetti, S., Greco, C., Tortora, P., & Aprile, F. A. (2018). Targeting Amyloid Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9). https://doi.org/10.3390/IJMS19092677

Gnann, & Whitley. (2017). Herpes Simplex Encephalitis: an Update. *Current Infectious Disease Reports*, *19*(3). https://doi.org/10.1007/S11908-017-0568-7

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, *6*, 260. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2015.08.010

Govindarajulu, M., Pinky, P. D., Steinke, I., Bloemer, J., Ramesh, S., Kariharan, T., Rella, R. T., Bhattacharya, S., Dhanasekaran, M., Suppiramaniam, V., & Amin, R. H. (2020). Gut Metabolite TMAO Induces Synaptic Plasticity Deficits by Promoting Endoplasmic Reticulum Stress. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *0*, 138. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00138

Gräff, & LH, T. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(2), 97–111. https://doi.org/10.1038/NRN3427

Gray, T. S., & Magnuson, D. J. (1987). Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *262*(3), 365–374. https://doi.org/10.1002/cne.902620304

Greig, N. H., Utsuki, T., Ingram, D. K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q.-S., Mamczarz, J., Holloway, H. W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., & Lahiri, D. K. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β-amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(47), 17213–17218. https://doi.org/10.1073/PNAS.0508575102

Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 15, Issue 4, pp. 226–237). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8

Grochowska, M., Laskus, T., & Radkowski, M. (2019). Gut Microbiota in Neurological Disorders. In *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 67, Issue 6, pp. 375–383). Birkhauser Verlag AG. https://doi.org/10.1007/s00005-019-00561-6

Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 124, Issue 1, pp. 3–20). NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038

Gu, Y., & Scarmeas, N. (2011). Dietary Patterns in Alzheimer's Disease and Cognitive Aging. *Current Alzheimer Research*, *8*(5), 510. /pmc/articles/PMC3283139/

Gu, & Z, G. (2013). Alzheimer's Aβ42 and Aβ40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of Neurochemistry*, *126*(3), 305–311. https://doi.org/10.1111/JNC.12202

Guilherme, M. dos S., Nguyen, V. T. T., Reinhardt, C., & Endres, K. (2021). Impact of Gut Microbiome Manipulation in 5xFAD Mice on Alzheimer's Disease-Like Pathology. *Microorganisms*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040815

Guilherme, Todorov, Osterhof, Möllerke, Cub, Hankeln, Gerber, & Endres. (2020). Impact of Acute and Chronic Amyloid-β Peptide Exposure on Gut Microbial Commensals in the Mouse. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01008

Guo, M., Peng, J., Huang, X., Xiao, L., Huang, F., & Zuo, Z. (2021). Gut Microbiome Features of Chinese Patients Newly Diagnosed with Alzheimer's Disease or Mild Cognitive Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, *80*(1), 299–310. https://doi.org/10.3233/JAD-201040

Gutiérrez, B., & Domingo-Calap, P. (2020). Phage Therapy in Gastrointestinal Diseases. *Microorganisms*, *8*(9), 1–11. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091420

Gutierrez, D., Weinstock, A., Antharam, V. C., Gu, H., Jasbi, P., Shi, X., Dirks, B., Krajmalnik-Brown, R., Maldonado, J., Guinan, J., & Thangamani, S. (2020). Antibiotic-induced gut metabolome and microbiome alterations increase the susceptibility to Candida albicans colonization in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(1). https://doi.org/10.1093/femsec/fiz187

Haass. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *The EMBO Journal*, *23*(3), 483–488. https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600061

Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmachers, M. G., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(5), 3021–3024. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53650-4

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic

Processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006270

Han, Tang, Dong, Song, Dong, Wang, & Du. (2017). Loss of nitrergic and cholinergic neurons in the enteric nervous system of APP/PS1 transgenic mouse model. *Neuroscience Letters*, *642*, 59–65. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.01.061

Hansen, M. B. (2003). The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacology and Toxicology*, *92*(3), 105–113. https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.t01-1-920301.x

Hansen, T. H., Thomassen, M. T., Madsen, M. L., Kern, T., Bak, E. G., Kashani, A., Allin, K. H., Hansen, T., & Pedersen, O. (2018). The effect of drinking water pH on the human gut microbiota and glucose regulation: results of a randomized controlled cross-over intervention. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34761-5

Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Coy, K. D. M., Frisoni, G., Neher, J. J., Fåk, F., Jucker, M., Lasser, T., & Bolmont, T. (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Scientific Reports*, *7*. https://doi.org/10.1038/SREP41802

Haran, J. P., Bhattarai, S. K., Foley, S. E., Dutta, P., Ward, D. V., Bucci, V., & McCormick, B. A. (2019). Alzheimer's Disease Microbiome Is Associated with Dysregulation of the Anti-Inflammatory P-Glycoprotein Pathway. *MBio*, *10*(3). https://doi.org/10.1128/MBIO.00632-19

Harwick, H. J., Iuppa, J. B., & Fekety, F. R. (1969). Microorganisms and amniotic fluid. *Obstetrics and Gynecology*, *33*(2), 256–259. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5775185

Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. In *PeerJ* (Vol. 2019, Issue 8). PeerJ Inc. https://doi.org/10.7717/peerj.7502

Hashweh, Z, B., R, K., & GT, G. (2020). An evaluation of hydromethylthionine as a treatment option for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *21*(6), 619–627. https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1719066

Hatat, B., Yahiaoui, S., Lecoutey, C., Davis, A., Freret, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2019a). 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 interest against Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*(JUN), 148. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00148

Hatat, Yahiaoui, Lecoutey, Davis, Freret, Boulouard, Claeysen, Rochais, & Dallemagne. (2019b). A Novel in vivo Anti-amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT 4 R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT 6 R) Inverse Agonist Activities, With a Potential I. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*(JUN). https://doi.org/10.3389/FNAGI.2019.00148

Hazan, S. (2020). Rapid improvement in Alzheimer's disease symptoms following fecal microbiota transplantation: a case report: *Https://Doi.Org/10.1177/0300060520925930*, *48*(6). https://doi.org/10.1177/0300060520925930

He, G., Shankar, R. A., Chzhan, M., Samouilov, A., Kuppusamy, P., & Zweier, J. L. (1999). Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(8), 4586–4591. https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4586

He, Y., Kosciolek, T., Tang, J., Zhou, Y., Li, Z., Ma, X., Zhu, Q., Yuan, N., Yuan, L., Li, C., Jin, K., Knight, R., Tsuang, M. T., & Chen, X. (2018). Gut microbiome and magnetic resonance spectroscopy study of subjects at ultra-high risk for psychosis may support the membrane hypothesis. *European Psychiatry*, *53*, 37–45. https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2018.05.011

Healy, E., Reichenberg, A., Nam, K. W., Allin, M. P. G., Walshe, M., Rifkin, L., Murray, S. R. M., & Nosarti, C. (2013). Preterm birth and adolescent social functioning-alterations in emotion-processing brain areas. *Journal of Pediatrics*, *163*(6), 1596–1604. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.08.011

Hegstrand, L. R., & Hine, R. J. (1986). Variations of brain histamine levels in germ-free and nephrectomized rats. *Neurochemical Research*, *11*(2), 185–191. https://doi.org/10.1007/BF00967967

Heijtz. (2016). Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, *21*(6), 410–417. https://doi.org/10.1016/J.SINY.2016.04.012

Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L.,

Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(7), 3047–3052. https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108

Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., & Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*, *12*(7), 656–670. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001957

Hérard, Petit, Gary, Guillermier, Boluda, Garin, Lam, & Dhenain. (2020). Induction of amyloid-β deposits from serially transmitted, histologically silent, Aβ seeds issued from human brains. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/S40478-020-01081-7

Heyck, M., & Ibarra, A. (2019). Microbiota and memory: A symbiotic therapy to counter cognitive decline? *Brain Circulation*, *5*(3), 124. https://doi.org/10.4103/bc.bc_34_19

Ho, L., Ono, K., Tsuji, M., Mazzola, P., Singh, R., & Pasinetti, G. M. (2018). Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in Alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *18*(1), 83–90. https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1400909

Hoffman, J. M., Tyler, K., MacEachern, S. J., Balemba, O. B., Johnson, A. C., Brooks, E. M., Zhao, H., Swain, G. M., Moses, P. L., Galligan, J. J., Sharkey, K. A., Greenwoodvan Meerveld, B., & Mawe, G. M. (2012). Activation of colonic mucosal 5-HT4 receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology*, *142*(4), 844. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.041

Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J., Furrie, E., & Flint, H. J. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, *39*(1), 33–39. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00904.x

Holmes, Boche, Wilkinson, Yadegarfar, Hopkins, Bayer, Jones, Bullock, Love, Neal, Zotova, & Nicoll. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet (London, England)*, *372*(9634), 216–223. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61075-2

Holsinger, R. M. D., & Elangovan, S. (2020). Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(S3). https://doi.org/10.1002/ALZ.046523

Homolak, J., Mudrovčić, M., Vukić, B., & Toljan, K. (2018). Circadian Rhythm and Alzheimer's

Disease. *Medical Sciences*, *6*(3), 52. https://doi.org/10.3390/MEDSCI6030052

Honarpisheh, Reynolds, Conesa, B., Manchon, M., Putluri, Bhattacharjee, Urayama, McCullough, & Ganesh. (2020). Dysregulated Gut Homeostasis Observed Prior to the Accumulation of the Brain Amyloid-β in Tg2576 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5). https://doi.org/10.3390/IJMS21051711

Hosoi, T., Okuma, Y., Matsuda, T., & Nomura, Y. (2005). Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: Possible role of nodose ganglion. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *120*(1–2), 104–107. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.11.012

Howard, R., Zubko, O., Bradley, R., Harper, E., Pank, L., O'Brien, J., Fox, C., Tabet, N., Livingston, G., Bentham, P., McShane, R., Burns, A., Ritchie, C., Reeves, S., Lovestone, S., Ballard, C., Noble, W., Nilforooshan, R., Wilcock, G., … Group, for the M. in A. D. E. (MADE) T. (2020). Minocycline at 2 Different Dosages vs Placebo for Patients With Mild Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, *77*(2), 164–174. https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2019.3762

Hsiao, E. Y. (2014). Gastrointestinal Issues in Autism Spectrum Disorder. *Harvard Review of Psychiatry*, *22*(2), 104–111. https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000029

Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., Patterson, P. H., & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, *155*(7), 1451–1463. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024

Huang, H., Xu, H., Luo, Q., He, J., Li, M., Chen, H., Tang, W., Nie, Y., & Zhou, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation to treat Parkinson's disease with constipation: A case report. *Medicine (United States)*, *98*(26). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000016163

Hubbard, T. D., Murray, I. A., & Perdew, G. H. (2015). Special section on drug metabolism and the microbiome - Minireview indole and tryptophan metabolism: Endogenous and dietary routes to ah receptor activation. In *Drug Metabolism and Disposition* (Vol. 43, Issue 10, pp. 1522–1535). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. https://doi.org/10.1124/dmd.115.064246

Hughes, H. K., & Ashwood, P. (2018). Anti-Candida albicans IgG antibodies in children with autism spectrum disorders. *Frontiers in Psychiatry*, *9*, 627.

https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00627

Hungate, R. E. (1979). EVOLUTION OF A MICROBIAL ECOLOGIST. In *Ann. Rev. Microbiol* (Vol. 33). www.annualreviews.org

Huo, R., Zeng, B., Zeng, L., Cheng, K., Li, B., Luo, Y., Wang, H., Zhou, C., Fang, L., Li, W., Niu, R., Wei, H., & Xie, P. (2017). Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(NOV). https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00489

Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., … White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207–214. https://doi.org/10.1038/nature11234

Hyland, N. P., & Cryan, J. F. (2010). A gut feeling about GABA: Focus on GABAB receptors. *Frontiers in Pharmacology*, *OCT*. https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00124

Ikeda, M., Brown, J., Holland, A. J., Fukuhara, R., & Hodges, J. R. (2002). Changes in appetite, food preference, and eating habits in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *73*(4), 371–376. https://doi.org/10.1136/JNNP.73.4.371

Ikram, M., Park, T. J., Ali, T., & Kim, M. O. (2020). Antioxidant and Neuroprotective Effects of Caffeine against Alzheimer's and Parkinson's Disease: Insight into the Role of Nrf-2 and A2AR Signaling. *Antioxidants*, *9*(9), 1–21. https://doi.org/10.3390/ANTIOX9090902

Ilhan, Z. E., Marcus, A. K., Kang, D.-W., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). pH-Mediated Microbial and Metabolic Interactions in Fecal Enrichment Cultures. *MSphere*, *2*(3). https://doi.org/10.1128/msphere.00047-17

Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Pérez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O. I., Soto, C., & Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid-β-Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, *16*(4), 881–891. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80108-7

Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Albasset, S., McManus, R. M., Tejera, D., Griep, A., Santarelli, F., Brosseron, F., Opitz, S., Stunden, J., Merten, M., Kayed, R., Golenbock, D. T., Blum, D., … Heneka, M. T. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature 2019 575:7784*, *575*(7784),

669–673. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z

Ismeurt, C., Giannoni, P., & Claeysen, S. (2020). The 5×FAD mouse model of Alzheimer's disease. *Diagnosis and Management in Dementia*, 207–221. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815854-8.00013-6

Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, *139*(3), 485–498. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033

Jack, C. R., Jr, Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Feldman, H. H., Frisoni, G. B., Hampel, H., Jagust, W. J., Johnson, K. A., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Scheltens, P., Sperling, R. A., & Dubois, B. (2016). A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*, *87*(5), 539. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002923

Jacka, F. N., O'Neil, A., Opie, R., Itsiopoulos, C., Cotton, S., Mohebbi, M., Castle, D., Dash, S., Mihalopoulos, C., Chatterton, M. Lou, Brazionis, L., Dean, O. M., Hodge, A. M., & Berk, M. (2017). A randomised controlled trial of dietary improvement for adults with major depression (the "SMILES" trial). *BMC Medicine*, *15*(1), 23. https://doi.org/10.1186/s12916-017-0791-y

Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., & Picaud, J. C. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *Journal of Pediatrics*, *158*(3), 390–396. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.09.007

Jadhav, S., Avila, J., Schöll, M., Kovacs, G. G., Kövari, E., Skrabana, R., Evans, L. D., Kontsekova, E., Malawska, B., Silva, R. de, Buee, L., & Zilka, N. (2019). A walk through tau therapeutic strategies. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 22. https://doi.org/10.1186/S40478-019-0664-Z

Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J. K., & Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long- term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS ONE*, *5*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009836

Janeiro, M. H., Ramírez, M. J., Milagro, F. I., Martínez, J. A., & Solas, M. (2018). Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic

Target. *Nutrients 2018, Vol. 10, Page 1398*, *10*(10), 1398. https://doi.org/10.3390/NU10101398

Jang, S. E., Lim, S. M., Jeong, J. J., Jang, H. M., Lee, H. J., Han, M. J., & Kim, D. H. (2018). Gastrointestinal inflammation by gut microbiota disturbance induces memory impairment in mice. *Mucosal Immunology*, *11*(2), 369–379. https://doi.org/10.1038/mi.2017.49

Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M. A., Liu, S., Glanz, B. L., Cook, S., Tankou, S., Stuart, F., Melo, K., Nejad, P., Smith, K., Topçuolu, B. D., Holden, J., Kivisäkk, P., … Weiner, H. L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications*, *7*. https://doi.org/10.1038/ncomms12015

Järbrink-Sehgal, E., & Andreasson, A. (2020). The gut microbiota and mental health in adults. *Current Opinion in Neurobiology*, *62*, 102–114. https://doi.org/10.1016/J.CONB.2020.01.016

Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Aβ aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *33*(1), 196.e29-196.e40. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2010.05.027

Jayaraman, A., & Pike, C. J. (2014). Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: Multiple Mechanisms Contribute to Interactions. *Current Diabetes Reports*, *14*(4), 476. https://doi.org/10.1007/S11892-014-0476-2

Jefferson, T., Keller, U. auf dem, Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E., Bond, J. S., Jayakumar, A., Traupe, H., Chalaris, A., Rose-John, S., Pietrzik, C. U., Postina, R., Overall, C. M., & Becker-Pauly, C. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(2), 309. https://doi.org/10.1007/S00018-012-1106-2

Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME Journal*, *1*(1), 56–66. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3

Ji, S. K., Yan, H., Jiang, T., Guo, C. Y., Liu, J. J., Dong, S. Z., Yang, K. L., Wang, Y. J., Cao, Z. J., & Li, S. L. (2017). Preparing the gut with antibiotics enhances gut microbiota reprogramming

efficiency by promoting xenomicrobiota colonization. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01208

Ji, Y., Yin, Y., Li, Z., & Zhang, W. (2019). Gut microbiota-derived components and metabolites in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 8, p. 1712). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu11081712

Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., & Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, *48*, 186–194. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016

Jiang, Zhang, Gao, Ou, Gong, Shi, Wu, & Zhou. (2018). TREM2 Ameliorates Neuronal Tau Pathology Through Suppression of Microglial Inflammatory Response. *Inflammation*, *41*(3), 811–823. https://doi.org/10.1007/S10753-018-0735-5

Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B. R., & Rubinsztein, D. C. (2017). Huntington's disease: Mechanisms of pathogenesis and therapeutic strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(7), 1–22. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024240

Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, *159*(3), 187–193. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007

Joachim, Mori, & Selkoe. (1989). Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature*, *341*(6239), 226–230. https://doi.org/10.1038/341226A0

Johansson, M. E. V., Jakobsson, H. E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F., & Hansson, G. C. (2015). Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host and Microbe*, *18*(5), 582–592. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1

Joie, R. La, Visani, A. V., Baker, S. L., Brown, J. A., Bourakova, V., Cha, J., Chaudhary, K., Edwards, L., Iaccarino, L., Janabi, M., Lesman-Segev, O. H., Miller, Z. A., Perry, D. C., O'Neil, J. P., Pham, J., Rojas, J. C., Rosen, H. J., Seeley, W. W., Tsai, R. M., … Rabinovici, G.

D. (2020). Prospective longitudinal atrophy in Alzheimer's disease correlates with the intensity and topography of baseline tau-PET. *Science Translational Medicine*, *12*(524), 5732. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAU5732

Joo, S. S., Won, T. J., & Lee, D. I. (2004). Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of Nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). *Archives of Pharmacal Research 2004 27:9*, *27*(9), 954–960. https://doi.org/10.1007/BF02975850

Jouanne, M., Rault, S., & Voisin-Chiret, A. S. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *139*, 153–167. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.07.070

Juan, C. A., Lastra, J. M. P. de la, Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 4642*, *22*(9), 4642. https://doi.org/10.3390/IJMS22094642

Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 15e | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical. (n.d.).

Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. In *Fluids and Barriers of the CNS* (Vol. 17, Issue 1, p. 69). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3

Kamer, Pirraglia, Tsui, Rusinek, Vallabhajosula, Mosconi, Yi, McHugh, Craig, Svetcov, Linker, Shi, Glodzik, Williams, Corby, Saxena, & Leon, D. (2015). Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 627–633. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.10.038

Kang, D. W., Adams, J. B., Coleman, D. M., Pollard, E. L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2019a). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0

Kang, D. W., Adams, J. B., Coleman, D. M., Pollard, E. L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2019b). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0

Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Pollard, E. L., Roux, S., Sadowsky, M. J., Lipson, K. S., Sullivan, M. B., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2017a). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7

Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Pollard, E. L., Roux, S., Sadowsky, M. J., Lipson, K. S., Sullivan, M. B., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2017b). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. In *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 300–305). Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Kaur, Sharma, & Deshmukh. (2019). Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, *27*(4), 663–677. https://doi.org/10.1007/S10787-019-00580-X

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue SEP, p. 461). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461

Kelly, J. R., Borre, Y., O' Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., Kennedy, P. J., Beers, S., Scott, K., Moloney, G., Hoban, A. E., Scott, L., Fitzgerald, P., Ross, P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2016). Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, *82*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019

Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., Mutlu, E., & Shannon, K. M. (2015). Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *30*(10), 1351–1360. https://doi.org/10.1002/mds.26307

Kiecker, C. (2018). The origins of the circumventricular organs. *Journal of Anatomy*, *232*(4), 540. https://doi.org/10.1111/JOA.12771

Kielbasa, W., Phipps, K. M., Tseng, J., Natanegara, F., Cheng, E., Monk, S. A., Bundgaard, C., Kevin, D. B., Nuthall, H. N., McDonald, N., Lindsay-Scott, P., Dreyfus, N., Hawk, M. K., Warner, S., Biglan, K., Gilmore, J. A., Zhang, X., Mergott, D. J., & Lowe, S. L. (2020). A single

ascending dose study in healthy volunteers to assess the safety and PK of LY3372689, an inhibitor of O-GlcNAcase (OGA) enzyme. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(S9), e040473. https://doi.org/10.1002/ALZ.040473

Kim, D. K., Park, J., Han, D., Yang, J., Kim, A., Woo, J., Kim, Y., & Mook-Jung, I. (2018). Molecular and functional signatures in a novel Alzheimer's disease mouse model assessed by quantitative proteomics. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S13024-017-0234-4

Kim, J. J., & Jo, E. K. (2013). NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. In *Journal of Korean Medical Science* (Vol. 28, Issue 10, pp. 1415–1423). Korean Academy of Medical Science. https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.10.1415

Kim, Kim, Choi, Kim, Park, Lee, Kim, Kim, Choi, Hyun, Lee, Choi, Lee, Bae, & Mook-Jung. (2020). Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. *Gut*, *69*(2), 283–294. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2018-317431

Kim, Maeng, Yu, Lee, Tsuruo, Kim, Shim, & Chung. (2010). Evidence of carrier-mediated transport in the penetration of donepezil into the rat brain. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(3), 1548–1566. https://doi.org/10.1002/JPS.21895

Kim, S. H., Ahn, J. H., Yang, H., Lee, P., Koh, G. Y., & Jeong, Y. (2020). Cerebral amyloid angiopathy aggravates perivascular clearance impairment in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathologica Communications 2020 8:1*, *8*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/S40478-020-01042-0

Kim, S., Kwon, S. H., Kam, T. I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Lee, J. H., Kim, W. R., Kook, M., Foss, C. A., Shen, C., Lee, H., Kulkarni, S., Pasricha, P. J., Lee, G., Pomper, M. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ko, H. S. (2019). Transneuronal Propagation of Pathologic α-Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*, *103*(4), 627-641.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.035

Kim, Y. K., Shin, J. S., & Nahm, M. H. (2016). NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. In *Yonsei Medical Journal* (Vol. 57, Issue 1, pp. 5–14). Yonsei University College of Medicine. https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5

Kins, Lauther, Szodorai, & Beyreuther. (2006). Subcellular trafficking of the amyloid precursor protein gene family and its pathogenic role in Alzheimer's disease. *Neuro-Degenerative Diseases*, *3*(4–5), 218–226. https://doi.org/10.1159/000095259

Kiraly, D. D., Walker, D. M., Calipari, E. S., Labonte, B., Issler, O., Pena, C. J., Ribeiro, E. A., Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2016). Alterations of the host microbiome affect behavioral responses to cocaine. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep35455

Klein, Kowall, & Ferrante. (1999). Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *893*, 314–320. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1999.TB07845.X

Knoop, K. A., & Newberry, R. D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. In *Mucosal Immunology* (Vol. 11, Issue 6, pp. 1551–1557). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41385-018-0039-y

Kobayashi, Y., Sugahara, H., Shimada, K., Mitsuyama, E., Kuhara, T., Yasuoka, A., Kondo, T., Abe, K., & Xiao, J. (2017). Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13368-2

Kong, G., Cao, K. A. L., Judd, L. M., Li, S. S., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2020). Microbiome profiling reveals gut dysbiosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *135*, 104268. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.09.001

Kopeikina, K. J., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. *Translational Neuroscience*, *3*(3), 223. https://doi.org/10.2478/S13380-012-0032-Y

Kornhuber. (1996). Propionibacterium acnes in the cortex of patients with Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *246*(2), 108–109. https://doi.org/10.1007/BF02274902

Kryscio, R. J., Abner, E. L., Caban-Holt, A., Lovell, M., Goodman, P., Darke, A. K., Yee, M., Crowley, J., & Schmitt, F. A. (2017). Association of Antioxidant Supplement Use and Dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA Neurology*, *74*(5), 567–573. https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2016.5778

Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W. (2020). Alzheimer Disease. *StatPearls*, 1–27. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/

Kumar, S., & Walter, J. (2011). Phosphorylation of amyloid beta (Aβ) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging*, *3*(8), 803–812. https://doi.org/10.18632/AGING.100362

Kutzsche, Jürgens, Willuweit, Adermann, Fuchs, Simons, Windisch, Hümpel, Rossberg, Wolzt, & Willbold. (2020). Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)*, *6*(1). https://doi.org/10.1002/TRC2.12001

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., … Amouyel, P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics 2013 45:12*, *45*(12), 1452–1458. https://doi.org/10.1038/ng.2802

Lannfelt, L., Blennow, K., Zetterberg, H., Batsman, S., Ames, D., Harrison, J., Masters, C. L., Targum, S., Bush, A. I., Murdoch, R., Wilson, J., & Ritchie, C. W. (2008). Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Aβ as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, *7*(9), 779–786. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70167-4

Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M.-G., Barkats, M., Lacor, P., Klein, W., Bauer, C., & Checler, F. (2016). Intraneuronal aggregation of the β-CTF fragment of APP (C99) induces Aβ-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathologica*, *132*(2), 257. https://doi.org/10.1007/S00401-016-1577-6

Le Roy, C. I., Wells, P. M., Si, J., Raes, J., Bell, J. T., & Spector, T. D. (2020). Red Wine Consumption Associated With Increased Gut Microbiota α-Diversity in 3 Independent Cohorts. *Gastroenterology*, *158*(1), 270-272.e2. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.024

Le Roy, T., Debédat, J., Marquet, F., Da-Cunha, C., Ichou, F., Guerre-Millo, M., Kapel, N., Aron-Wisnewsky, J., & Clément, K. (2019). Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter. *Frontiers in Microbiology*, *0*(JAN), 3289. https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.03289

Leclercq, S., Le Roy, T., Furgiuele, S., Coste, V., Bindels, L. B., Leyrolle, Q., Neyrinck, A. M., Quoilin, C., Amadieu, C., Petit, G., Dricot, L., Tagliatti, V., Cani, P. D., Verbeke, K., Colet, J. M., Stärkel, P., de Timary, P., & Delzenne, N. M. (2020). Gut Microbiota-Induced Changes in β-Hydroxybutyrate Metabolism Are Linked to Altered Sociability and Depression in

Alcohol Use Disorder. *Cell Reports*, *33*(2), 108238. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108238

Leclercq, S., Mian, F. M., Stanisz, A. M., Bindels, L. B., Cambier, E., Ben-Amram, H., Koren, O., Forsythe, P., & Bienenstock, J. (2017). Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nature Communications*, *8*. https://doi.org/10.1038/ncomms15062

Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., Bouet, V., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert Fréon, A., Mignani, S., Cresteil, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2014). Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(36), E3825-30. https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111

Lee, H.-J., Lee, K.-E., Kim, J.-K., & Kim, D.-H. (2019). Suppression of gut dysbiosis by Bifidobacterium longum alleviates cognitive decline in 5XFAD transgenic and aged mice. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-019-48342-7

Lee, H. J., Lim, S. M., & Kim, D. H. (2018). Lactobacillus johnsonii cjlj103 attenuates scopolamine-induced memory impairment in mice by increasing BDNF expression and inhibiting NF-κB activation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(9), 1443–1446. https://doi.org/10.4014/jmb.1805.05025

Lee, J., Duan, W., & Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, *82*(6), 1367–1375. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01085.x

Lee, Lee, Yuk, Choi, Ban, Oh, & Hong. (2008). Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of Neuroinflammation*, *5*. https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-37

Lee, Li, Juan, Chang, Yeh, Tsai, Chueh, Wu, & Yang. (2017). Urinary Incontinence in Alzheimer's Disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, *32*(1), 51–55. https://doi.org/10.1177/1533317516680900

Lee, N. Y., & Kang, Y. S. (2010). The inhibitory effect of rivastigmine and galantamine on choline transport in brain capillary endothelial cells. *Biomolecules and Therapeutics*, *18*(1), 65–70. https://doi.org/10.4062/BIOMOLTHER.2010.18.1.065

Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., & Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4615–4622. https://doi.org/10.1073/pnas.1000082107

Legroux, L., & Arbour, N. (2015). Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. In *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 528–546). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s11481-015-9614-0

Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. I., Spoerri, L., Ciccotosto, G. D., Wright, D. K., Wong, B. X. W., Adlard, P. A., Cherny, R. A., Lam, L. Q., Roberts, B. R., Volitakis, I., Egan, G. F., McLean, C. A., Cappai, R., Duce, J. A., & Bush, A. I. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nature Medicine 2012 18:2*, *18*(2), 291–295. https://doi.org/10.1038/nm.2613

Lelouvier, B., Servant, F., Païssé, S., Brunet, A. C., Benyahya, S., Serino, M., Valle, C., Ortiz, M. R., Puig, J., Courtney, M., Federici, M., Fernández-Real, J. M., Burcelin, R., & Amar, J. (2016). Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology*, *64*(6), 2015–2027. https://doi.org/10.1002/hep.28829

Lenoir, Martín, Torres-Maravilla, Chadi, González-Dávila, Sokol, Langella, Chain, & Bermúdez-Humarán. (2020). Butyrate mediates anti-inflammatory effects of Faecalibacterium prausnitzii in intestinal epithelial cells through Dact3. *Gut Microbes*, *12*(1), 1–16. https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1826748

Levy, A. N., & Allegretti, J. R. (2019). Insights into the role of fecal microbiota transplantation for the treatment of inflammatory bowel disease. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 12). SAGE Publications Ltd. https://doi.org/10.1177/1756284819836893

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 11070–11075. https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature 2006 444:7122*, *444*(7122), 1022–1023. https://doi.org/10.1038/4441022A

Li, B., He, Y., Ma, J., Huang, P., Du, J., Cao, L., Wang, Y., Xiao, Q., Tang, H., & Chen, S. (2019). Mild cognitive impairment has similar alterations as Alzheimer's disease in gut microbiota. *Alzheimer's & Dementia*, *15*(10), 1357–1366. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2019.07.002

Li, H., Sun, J., Du, J., Wang, F., Fang, R., Yu, C., Xiong, J., Chen, W., Lu, Z., & Liu, J. (2018). Clostridium butyricum exerts a neuroprotective effect in a mouse model of traumatic brain injury via the gut-brain axis. *Neurogastroenterology and Motility*, *30*(5). https://doi.org/10.1111/nmo.13260

Li, H., Sun, J., Wang, F., Ding, G., Chen, W., Fang, R., Yao, Y., Pang, M., Lu, Z. Q., & Liu, J. (2016). Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain Research*, *1642*, 70–78. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.031

Li, Ke, Zhan, Liu, Zhao, Zeng, Shi, Ji, Cheng, Pan, Zheng, & Hong. (2018). Trimethylamine-N-oxide promotes brain aging and cognitive impairment in mice. *Aging Cell*, *17*(4). https://doi.org/10.1111/ACEL.12768

Li, T.-H., Liu, L., Hou, Y.-Y., Shen, S.-N., & Wang, T.-T. (2019). C-type lectin receptor-mediated immune recognition and response of the microbiota in the gut. *Gastroenterology Report*, *7*(5), 312–321. https://doi.org/10.1093/GASTRO/GOZ028

Li, W., Chen, M., Feng, X., Song, M., Shao, M., Yang, Y., Zhang, L., Liu, Q., Lv, L., & Su, X. (2021). Maternal immune activation alters adult behavior, intestinal integrity, gut microbiota and the gut inflammation. *Brain and Behavior*, e02133. https://doi.org/10.1002/brb3.2133

Li, X.-L., Hu, N., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2014). Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/927804

Liang, Wang, Hu, Luo, Li, Wu, Duan, & Jin. (2015). Administration of Lactobacillus helveticus NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, *310*. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.09.033

Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. In *Immunity* (Vol. 46, Issue 6, pp. 957–967). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

Lin, A., Zheng, W., He, Y., Tang, W., Wei, X., He, R., Huang, W., Su, Y., Huang, Y., Zhou, H., & Xie, H. (2018). Gut microbiota in patients with Parkinson's disease in southern China. *Parkinsonism and Related Disorders*, *53*, 82–88. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.05.007

Lin, MA, W., RJ, C., GK, W., & RF, I. (2002). Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *The Journal of Pathology*, *197*(3), 395–402. https://doi.org/10.1002/PATH.1127

Lin, P., Ding, B., Feng, C., Yin, S., Zhang, T., Qi, X., Lv, H., Guo, X., Dong, K., Zhu, Y., & Li, Q. (2017). Prevotella and Klebsiella proportions in fecal microbial communities are potential characteristic parameters for patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, *207*, 300–304. https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.09.051

Lin, Wozniak, RJ, C., GK, W., & RF, I. (2002). Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *The Journal of Pathology*, *197*(3), 395–402. https://doi.org/10.1002/PATH.1127

Linard, M., Baillet, M., Letenneur, L., Garrigue, I., Catheline, G., Dartigues, J.-F., Peres, K., & Helmer, C. (2021). Herpes simplex virus, early neuroimaging markers and incidence of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry 2021 11:1*, *11*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41398-021-01532-2

Ling, Z., Zhu, M., Liu, X., Shao, L., Cheng, Y., Yan, X., Jiang, R., & Wu, S. (2020). Fecal Fungal Dysbiosis in Chinese Patients With Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.631460

Ling, Z., Zhu, M., Yan, X., Cheng, Y., Shao, L., Liu, X., Jiang, R., & Wu, S. (2020). Structural and Functional Dysbiosis of Fecal Microbiota in Chinese Patients With Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 634069. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.634069

Link, A., Balaguer, F., Shen, Y., Nagasaka, T., Lozano, J. J., Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Fecal microRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *19*(7), 1766–1774. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0027

Link, C. D. (2021). Is There a Brain Microbiome? *Neuroscience Insights*, *16*. https://doi.org/10.1177/26331055211018709

Lionnet, A., Wade, M. A., Corbillé, A.-G., Prigent, A., Paillusson, S., Tasselli, M., Gonzales, J., Durieu, E., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Duchalais, E., Neunlist, M., Perkinton, M. S., Hanger, D. P., Noble, W., & Derkinderen, P. (2018). Characterisation of tau in the human

and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/S40478-018-0568-3

Lipsky, R. H., & Marini, A. M. (2007). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Survival and Behavior-Related Plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1122*(1), 130–143. https://doi.org/10.1196/annals.1403.009

Liu, C. Y., Yang, Y., Ju, W. N., Wang, X., & Zhang, H. L. (2018). Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of alzheimer's disease. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12, p. 193). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00193

Liu, K, I., I, G.-I., GW, H., & CX, G. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(29), 10804–10809. https://doi.org/10.1073/PNAS.0400348101

Liu, Lin, He, Chen, Dai, Jia, Xue, Tao, & Chen. (2020). Neurogranin as a cognitive biomarker in cerebrospinal fluid and blood exosomes for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Translational Psychiatry*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/S41398-020-0801-2

Liu, P., Wu, L., Peng, G., Han, Y., Tang, R., Ge, J., Zhang, L., Jia, L., Yue, S., Zhou, K., Li, L., Luo, B., & Wang, B. (2019). Altered microbiomes distinguish Alzheimer's disease from amnestic mild cognitive impairment and health in a Chinese cohort. *Brain, Behavior, and Immunity*, *80*, 633–643. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.05.008

Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R., & Weiner, H. L. (2016). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host and Microbe*, *19*(1), 32–43. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005

Liu, W., Sun, F., Wan, M., Jiang, F., Bo, X., Lin, L., Tang, H., & Xu, S. (2017). β-Sheet Breaker Peptide-HPYD for the Treatment of Alzheimer's Disease: Primary Studies on Behavioral Test and Transcriptional Profiling. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(JAN), 969. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00969

Llopis, Cassard, Wrzosek, Boschat, Bruneau, Ferrere, Puchois, Martin, Lepage, Le, Lefèvre, Langelier, Cailleux, González-Castro, Rabot, Gaudin, Agostini, Prévot, Berrebi, … Perlemuter. (2016). Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to

alcoholic liver disease. *Gut*, *65*(5), 830–839. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2015-310585

Loo, Y. M., & Gale, M. (2011). Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. In *Immunity* (Vol. 34, Issue 5, pp. 680–692). NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003

Louis, P., & Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, *294*(1), 1–8. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2009.01514.X

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 29–41. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589

Lu, J., Lu, L., Yu, Y., Cluette-Brown, J., Martin, C. R., & Claud, E. C. (2018). Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-23692-w

Lubomski, M., Davis, R. L., & Sue, C. M. (2020). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *267*(5), 1377–1388. https://doi.org/10.1007/s00415-020-09723-5

Lucas, J. L., Mirshahpanah, P., Haas-Stapleton, E., Asadullah, K., Zollner, T. M., & Numerof, R. P. (2009). Induction of Foxp3+ regulatory T cells with histone deacetylase inhibitors. *Cellular Immunology*, *257*(1–2), 97–104. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.03.004

Lugt, van der, AA, van B., S, A., B, M., B, S., WP, V., RMC, B., WM, de V., HFJ, S., WT, S., & C, B. (2019). Akkermansia muciniphila ameliorates the age-related decline in colonic mucus thickness and attenuates immune activation in accelerated aging Ercc1 -/Δ7 mice. *Immunity & Ageing : I & A*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/S12979-019-0145-Z

Ma, Zhao, Sagare, Wu, Wang, Owens, Verghese, Herz, Holtzman, & Zlokovic. (2018). Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid-β42 by LRP1-dependent apolipoprotein E isoform-specific mechanism. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S13024-018-0286-0

Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013a). Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. In *Mucosal Immunology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 666–677). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/mi.2013.30

Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013b). Microfold

(M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. In *Mucosal Immunology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 666–677). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/mi.2013.30

Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*, *8*(2), 184. https://doi.org/10.3390/cells8020184

Maitre, Klein, Patte-Mensah, & Mensah-Nyagan. (2020). Tryptophan metabolites modify brain Aβ peptide degradation: A role in Alzheimer's disease? *Progress in Neurobiology*, *190*. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2020.101800

Makkawi, S., Camara-Lemarroy, C., & Metz, L. (2018). Fecal microbiota transplantation associated with 10 years of stability in a patient with SPMS. *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, *5*(3), 459. https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000459

Mandell, & GA, B. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(18), 5727–5740. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-18-05727.1996

Manichanh, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., Guigo, R., Knight, R., & Guarner, F. (2010). Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Research*, *20*(10), 1411–1419. https://doi.org/10.1101/gr.107987.110

Manivannan, Y., Manivannan, B., Beach, T. G., & Halden, R. U. (2015). Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Current Alzheimer Research*, *12*(2), 116. https://doi.org/10.2174/1567205012666150204121719

Mansuroglu, H, B.-M., V, M., A, S., M, V., A, C., L, D., A, L., S, T., S, B., F, N., M, C., S, S., B, L., L, B., MC, G., & E, B. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/SREP33047

Mantile, F., & Prisco, A. (2020). Vaccination against β-Amyloid as a Strategy for the Prevention of Alzheimer's Disease. *Biology*, *9*(12), 1–21. https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9120425

Manzine, P. R., Ettcheto, M., Cano, A., Busquets, O., Marcello, E., Pelucchi, S., Di Luca, M., Endres, K., Olloquequi, J., Camins, A., & Cominetti, M. R. (2019). ADAM10 in Alzheimer's disease: Pharmacological modulation by natural compounds and its role as a peripheral

marker. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *113*, 108661. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108661

Maolood, N., & Meister, B. (2009). Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *37*(3), 182–195. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2008.12.007

Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., Issad, T., Gerhardt, E., Pagesy, P., Vileno, M., Bournonville, C., Hamdane, M., Bantubungi, K., Lancel, S., Demeyer, D., Eddarkaoui, S., Vallez, E., Vieau, D., Humez, S., … Blum, D. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(8), 2257. https://doi.org/10.1084/JEM.20161731

Marcobal, A., Barboza, M., Froehlich, J. W., Block, D. E., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2010). Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(9), 5334–5340. https://doi.org/10.1021/jf9044205

Marín-Teva, J. L., Cuadros, M. A., Martín-Oliva, D., & Navascués, J. (2012). Microglia and neuronal cell death. In *Neuron Glia Biology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 25–40). Neuron Glia Biol. https://doi.org/10.1017/S1740925X12000014

Marizzoni, M., Cattaneo, A., Mirabelli, P., Festari, C., Lopizzo, N., Nicolosi, V., Mombelli, E., Mazzelli, M., Luongo, D., Naviglio, D., Coppola, L., Salvatore, M., & Frisoni, G. B. (2020). Short-Chain Fatty Acids and Lipopolysaccharide as Mediators Between Gut Dysbiosis and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *78*(2), 683–697. https://doi.org/10.3233/JAD-200306

Marksteiner, J., Blasko, I., Kemmler, G., Koal, T., & Humpel, C. (2017). Bile acid quantification of 20 plasma metabolites identifies lithocholic acid as a putative biomarker in Alzheimer's disease. *Metabolomics 2017 14:1*, *14*(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/S11306-017-1297-5

Martínez-Maldonado, A., Ontiveros-Torres, M. Á., Harrington, C. R., Montiel-Sosa, J. F., Prandiz, R. G.-T., Bocanegra-López, P., Sorsby-Vargas, A. M., Bravo-Muñoz, M., Florán-Garduño, B., Villanueva-Fierro, I., Perry, G., Garcés-Ramírez, L., Cruz, F. de la, Martínez-Robles, S., Pacheco-Herrero, M., & Luna-Muñoz, J. (2021). Molecular Processing of Tau Protein in Progressive Supranuclear Palsy: Neuronal and Glial Degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, *79*(4), 1517. https://doi.org/10.3233/JAD-201139

Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, *349*(9064), 1546–1549. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)10203-8

Maynard, Cappai, Volitakis, Cherny, White, Beyreuther, Masters, Bush, & Li. (2002). Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 44670–44676. https://doi.org/10.1074/JBC.M204379200

Mazzei, G., Ikegami, R., Abolhassani, N., Haruyama, N., Sakumi, K., Saito, T., Saido, T. C., & Nakabeppu, Y. (2021). A high-fat diet exacerbates the Alzheimer's disease pathology in the hippocampus of the AppNL−F/NL−F knock-in mouse model. *Aging Cell*, *20*(8), e13429. https://doi.org/10.1111/ACEL.13429

Mazzoli, R., & Pessione, E. (2016). The neuro-endocrinological role of microbial glutamate and GABA signaling. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue NOV, p. 1934). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01934

McAlpine, C. S., Park, J., Griciuc, A., Kim, E., Choi, S. H., Iwamoto, Y., Kiss, M. G., Christie, K. A., Vinegoni, C., Poller, W. C., Mindur, J. E., Chan, C. T., He, S., Janssen, H., Wong, L. P., Downey, J., Singh, S., Anzai, A., Kahles, F., … Swirski, F. K. (2021). Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease. *Nature 2021*, 1–6. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03734-6

McCorvy, J. D., & Roth, B. L. (2015). Structure and Function of Serotonin G protein Coupled Receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *150*, 129. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2015.01.009

McKinley, E. T., Sui, Y., Al-Kofahi, Y., Millis, B. A., Tyska, M. J., Roland, J. T., Santamaria-Pang, A., Ohland, C. L., Jobin, C., Franklin, J. L., Lau, K. S., Gerdes, M. J., & Coffey, R. J. (2017). Optimized multiplex immunofluorescence single-cell analysis reveals tuft cell heterogeneity. *JCI Insight*, *2*(11). https://doi.org/10.1172/jci.insight.93487

Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Cour, C. M. la, Loiseau, F., Watson, D. J. G., Dekeyne, A., Séveno, M., Rivet, J.-M., Gaven, F., Déléris, P., Hervé, D., Fone, K. C. F., Bockaert, J., Millan, M. J., & Marin, P. (2012). 5-HT6 receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(10), 1043. https://doi.org/10.1002/EMMM.201201410

Mehta, D. C., Short, J. L., & Nicolazzo, J. A. (2013). Memantine Transport across the Mouse Blood–Brain Barrier Is Mediated by a Cationic Influx H+ Antiporter. *Molecular*

Pharmaceutics, *10*(12), 4491–4498. https://doi.org/10.1021/MP400316E

Menet, M. C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2011*(437), 41–53. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71211-4

Menglian, Yang, S., Cai, L., Qin, L. qiang, Li, B. yan, & Wan, Z. (2018). Effects of Quercetin Intervention on Cognition Function in APP/PS1 Mice was Affected by Vitamin D Status. *Molecular Nutrition and Food Research*, *62*(24). https://doi.org/10.1002/mnfr.201800621

Meslier, V., Laiola, M., Roager, H. M., Filippis, F. De, Roume, H., Quinquis, B., Giacco, R., Mennella, I., Ferracane, R., Pons, N., Pasolli, E., Rivellese, A., Dragsted, L. O., Vitaglione, P., Ehrlich, S. D., & Ercolini, D. (2020). Original research: Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut*, *69*(7), 1258. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2019-320438

Mielech, Puścion-Jakubik, Markiewicz-Żukowska, & Socha. (2020). Vitamins in Alzheimer's Disease-Review of the Latest Reports. *Nutrients*, *12*(11), 1–15. https://doi.org/10.3390/NU12113458

Mielke, M. M. (2018). Sex and Gender Differences in Alzheimer's Disease Dementia. *The Psychiatric Times*, *35*(11), 14. /pmc/articles/PMC6390276/

Mignon, L., Kordasiewicz, H., Lane, R., Smith, A., Miller, T., Narayanan, P., Swayze, E., Norris, D., Fitzsimmons, B., & Bennett, F. (2018). Design of the First-in-Human Study of IONIS-MAPTRx, a Tau-lowering Antisense Oligonucleotide, in Patients With Alzheimer Disease (S2.006). *Neurology*, *90*(15 Supplement).

Miklossy, Khalili, Gern, Ericson, Darekar, Bolle, Hurlimann, & Paster. (2004). Borrelia burgdorferi persists in the brain in chronic lyme neuroborreliosis and may be associated with Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *6*(6), 639–649. https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6608

Miller, A. L., Bessho, S., Grando, K., & Tükel, Ç. (2021). Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Frontiers in Immunology*, *0*, 514. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.638867

Miller, I. (2018). The gut–brain axis: historical reflections. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *29*(2), 1542921. https://doi.org/10.1080/16512235.2018.1542921

Milligan, C. E. (2000). Caspase cleavage of APP results in a cytotoxic proteolytic peptide.

Nature Medicine 2000 6:4, *6*(4), 385–386. https://doi.org/10.1038/74644

Miners, N, B., PG, K., S, G., & S, L. (2011). Aβ-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *70*(11), 944–959. https://doi.org/10.1097/NEN.0B013E3182345E46

Minter, Hinterleitner, Meisel, Zhang, Leone, Zhang, Oyler-Castrillo, Zhang, Musch, Shen, Jabri, Chang, Tanzi, & Sisodia. (2017). Antibiotic-induced perturbations in microbial diversity during post-natal development alters amyloid pathology in an aged APP SWE/PS1 ΔE9 murine model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-017-11047-W

Minter, M. R., Zhang, C., Leone, V., Ringus, D. L., Zhang, X., Oyler-Castrillo, P., Musch, M. W., Liao, F., Ward, J. F., Holtzman, D. M., Chang, E. B., Tanzi, R. E., & Sisodia, S. S. (2016). Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep30028

Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A., Deo, S. K., Daunert, S., & Liu, X. Z. (2017). Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(9), 2359–2372. https://doi.org/10.1002/jcp.25518

Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Tomita, A., Sato, W., Kim, S. W., Morita, H., Hattori, M., & Yamamura, T. (2015). Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS ONE*, *10*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137429

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 2, pp. 240–273). American Society for Microbiology (ASM). https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08

Möhle, L., Mattei, D., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fischer, A., Alutis, M., French, T., Hambardzumyan, D., Matzinger, P., Dunay, I. R., & Wolf, S. A. (2016). Ly6Chi Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Reports*, *15*(9), 1945–1956. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.074

Monteggia, L. M., Barrot, M., Powell, C. M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S.,

Nagy, A., Greene, R. W., & Nestler, E. J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(29), 10827–10832. https://doi.org/10.1073/pnas.0402141101

Morita, N., Umemoto, E., Fujita, S., Hayashi, A., Kikuta, J., Kimura, I., Haneda, T., Imai, T., Inoue, A., Mimuro, H., Maeda, Y., Kayama, H., Okumura, R., Aoki, J., Okada, N., Kida, T., Ishii, M., Nabeshima, R., & Takeda, K. (2019). GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells by bacterial metabolites. *Nature*, *566*(7742), 110–114. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0884-1

Mortensen, P. B., Nørgaard-Pedersen, B., Waltoft, B. L., Sørensen, T. L., Hougaard, D., Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2007). Toxoplasma gondii as a Risk Factor for Early-Onset Schizophrenia: Analysis of Filter Paper Blood Samples Obtained at Birth. *Biological Psychiatry*, *61*(5), 688–693. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.05.024

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). High-Level Neuronal Expression of Aβ1–42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. *Journal of Neuroscience*, *20*(11), 4050–4058. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04050.2000

Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of Amyloid β-Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006338

Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Naini, S. M. A., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Buée, L., Goedert, M., & Brion, J.-P. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathologica Communications 2017 5:1*, *5*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/S40478-017-0488-7

Mueller, N. T., Whyatt, R., Hoepner, L., Oberfield, S., Dominguez-Bello, M. G., Widen, E. M., Hassoun, A., Perera, F., & Rundle, A. (2015). Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *International Journal of Obesity*, *39*, 665–670. https://doi.org/10.1038/ijo.2014.180

Mullane, K., & Williams, M. (2019). Preclinical Models of Alzheimer's Disease: Relevance and Translational Validity. *Current Protocols in Pharmacology*, *84*(1). https://doi.org/10.1002/CPPH.57

Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience 2017 18:5*, *18*(5), 281–298. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29

Müller, U. C., & Zheng, H. (2012). Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(2). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006288

Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. In *Nutrition and Healthy Aging* (Vol. 4, Issue 4, pp. 267–285). IOS Press. https://doi.org/10.3233/NHA-170030

Nagpal, R., Neth, B. J., Wang, S., Mishra, S. P., Craft, S., & Yadav, H. (2020). Gut mycobiome and its interaction with diet, gut bacteria and alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment: A pilot study. *EBioMedicine*, *59*. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2020.102950

Naimi, E, V., AT, G., & B, C. (2021). Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/S40168-020-00996-6

Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L.-S., Vardarajan, B. N., Buros, J., Gallins, P. J., Buxbaum, J. D., Jarvik, G. P., Crane, P. K., Larson, E. B., Bird, T. D., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Jager, P. L. De, Evans, D., Schneider, J. A., Carrasquillo, M. M., Ertekin-Taner, N., … Schellenberg, G. D. (2011). Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2uAP, CD33, and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *43*(5), 436. https://doi.org/10.1038/NG.801

Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., Wilson, R., & Rudi, K. (2014). Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology & Motility*, *26*(8), 1155–1162. https://doi.org/10.1111/nmo.12378

Nativio, R., Donahue, G., Berson, A., Lan, Y., Amlie-Wolf, A., Tuzer, F., Toledo, J. B., Gosai, S. J., Gregory, B. D., Torres, C., Trojanowski, J. Q., Wang, L.-S., Johnson, F. B., Bonini, N. M., & Berger, S. L. (2018). Dysregulation of the epigenetic landscape of normal aging in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience 2018 21:4*, *21*(4), 497–505. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0101-9

Nativio, R., Lan, Y., Donahue, G., Sidoli, S., Berson, A., Srinivasan, A. R., Shcherbakova, O., Amlie-Wolf, A., Nie, J., Cui, X., He, C., Wang, L.-S., Garcia, B. A., Trojanowski, J. Q., Bonini,

N. M., & Berger, S. L. (2020). An integrated multi-omics approach identifies epigenetic alterations associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics 2020 52:10*, *52*(10), 1024–1035. https://doi.org/10.1038/s41588-020-0696-0

Neher, J. J., Neniskyte, U., Hornik, T., & Brown, G. C. (2014). Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia*, *62*(9), 1463–1475. https://doi.org/10.1002/GLIA.22693

Neis, E. P. J. G., Dejong, C. H. C., & Rensen, S. S. (2015). The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 4, pp. 2930–2946). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu7042930

Nguyen, T. T., Kosciolek, T., Maldonado, Y., Daly, R. E., Martin, A. S., McDonald, D., Knight, R., & Jeste, D. V. (2019). Differences in gut microbiome composition between persons with chronic schizophrenia and healthy comparison subjects. *Schizophrenia Research*, *204*, 23–29. https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.09.014

Nhan, H. S., Chiang, K., & Koo, E. H. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathologica*, *129*(1), 1. https://doi.org/10.1007/S00401-014-1347-2

Nicoll, J. A. R., Buckland, G. R., Harrison, C. H., Page, A., Harris, S., Love, S., Neal, J. W., Holmes, C., & Boche, D. (2019). Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid-β immunization in Alzheimer's disease. *Brain*, *142*(7), 2113–2126. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWZ142

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318. https://doi.org/10.1126/science.1110647

Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*, 295. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.011008.145533

Nøhr, M. K., Egerod, K. L., Christiansen, S. H., Gille, A., Offermanns, S., Schwartz, T. W., & Møller, M. (2015). Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience*, *290*, 126–137. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.040

Nøhr, M. K., Pedersen, M. H., Gille, A., Egerod, K. L., Engelstoft, M. S., Husted, A. S., Sichlau, R. M., Grunddal, K. V., Poulsen, S. S., Han, S., Jones, R. M., Offermanns, S., & Schwartz, T.

W. (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology*, *154*(10), 3552–3564. https://doi.org/10.1210/en.2013-1142

Noristani, Verkhratsky, & Rodríguez. (2012). High tryptophan diet reduces CA1 intraneuronal β-amyloid in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, *11*(5), 810–822. https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2012.00845.X

Novak, P., Kovacech, B., Katina, S., Schmidt, R., Scheltens, P., Kontsekova, E., Ropele, S., Fialova, L., Kramberger, M., Paulenka-Ivanovova, N., Smisek, M., Hanes, J., Stevens, E., Kovac, A., Sutovsky, S., Parrak, V., Koson, P., Prcina, M., Galba, J., … Zilka, N. (2021). ADAMANT: a placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. *Nature Aging 2021 1:6*, *1*(6), 521–534. https://doi.org/10.1038/s43587-021-00070-2

O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. In *EMBO Reports* (Vol. 7, Issue 7, pp. 688–693). European Molecular Biology Organization. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731

O'Keane, V., Dinan, T. G., Scott, L., & Corcoran, C. (2005). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis measures after vagus nerve stimulation therapy in chronic depression. *Biological Psychiatry*, *58*(12), 963–968. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.04.049

Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal β-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, *26*(40), 10129–10140. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006

Oddo, S. (2012). The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, *4*(3), 941. /pmc/articles/PMC4111148/

Omenetti, S., & Pizarro, T. T. (2015). The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue DEC). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00639

P, S., PP, S., R, N., & SL, B. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, *166*(4), 822–839. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.07.050

Pagani, L., & Eckert, A. (2011). Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2011*. https://doi.org/10.4061/2011/925050

Païssé, S., Valle, C., Servant, F., Courtney, M., Burcelin, R., Amar, J., & Lelouvier, B. (2016). Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*, *56*(5), 1138–1147. https://doi.org/10.1111/TRF.13477

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 12, pp. 7577–7587). Springer India. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1

Pardossi-Piquard, R., & Checler, F. (2012). The physiology of the β-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *Journal of Neurochemistry*, *120*(SUPPL. 1), 109–124. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07475.X

Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *32*(11), 1959. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2012.126

Pardridge, W. M. (2020). Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *0*, 373. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2019.00373

Pereira, F. C., & Berry, D. (2017). Microbial nutrient niches in the gut. In *Environmental Microbiology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 1366–1378). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13659

Perez-Burgos, A., Wang, B., Mao, Y. K., Mistry, B., Neufeld, K. A. M. V., Bienenstock, J., & Kunze, W. (2013). Psychoactive bacteria Lactobacillus rhamnosus (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *304*(2). https://doi.org/10.1152/ajpgi.00128.2012

Pérez, M. J., Jara, C., & Quintanilla, R. A. (2018). Contribution of Tau Pathology to Mitochondrial Impairment in Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(JUL). https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00441

Peron, R., Vatanabe, I. P., Manzine, P. R., Camins, A., & Cominetti, M. R. (2018). Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, *11*(1). https://doi.org/10.3390/PH11010012

Peterson, D. A., McNulty, N. P., Guruge, J. L., & Gordon, J. I. (2007). IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. *Cell Host and Microbe*, *2*(5), 328–339. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.013

Phillips, J. G. P. (1910). The Treatment of Melancholia by the Lactic Acid Bacillus. *Journal of*

Mental Science, *56*(234), 422–430. https://doi.org/10.1192/bjp.56.234.422

Phillips, R. J., Walter, G. C., Ringer, B. E., Higgs, K. M., & Powley, T. L. (2009). Alpha-synuclein immunopositive aggregates in the myenteric plexus of the aging Fischer 344 rat. *Experimental Neurology*, *220*(1), 109–119. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2009.07.025

Pietrowski, M. J., Gabr, A. A., Kozlov, S., Blum, D., Halle, A., & Carvalho, K. (2021). Glial Purinergic Signaling in Neurodegeneration. *Frontiers in Neurology*, *0*, 743. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.654850

Pilger, C, B., D, L., A, T., & G, F. (2001). Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of Torpedo californica acetylcholinesterase using molecular docking. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, *19*(3–4), 288–296. https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00056-5

Pilotto, A., & Franceschi, M. (2014). Helicobacter pylori infection in older people. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(21), 6364. https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I21.6364

Pisa, Alonso, Juarranz, Rábano, & Carrasco. (2015). Direct visualization of fungal infection in brains from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *43*(2), 613–624. https://doi.org/10.3233/JAD-141386

Place, R. F., Noonan, E. J., & Giardina, C. (2005). HDAC inhibition prevents NF-κB activation by suppressing proteasome activity: Down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes IκBα. *Biochemical Pharmacology*, *70*(3), 394–406. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2005.04.030

Podolsky, D. K. (1999). V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *277*(3), G495–G499. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.3.g495

Polanco, J. C., Hand, G. R., Briner, A., Li, C., & Götz, J. (2021). Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol. *Acta Neuropathologica 2021 141:2*, *141*(2), 235–256. https://doi.org/10.1007/S00401-020-02254-3

Poole, Singhrao, Kesavalu, Curtis, & Crean. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *36*(4), 665–677.

https://doi.org/10.3233/JAD-121918

Porat, Y., Abramowitz, A., & Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*, *67*(1), 27–37. https://doi.org/10.1111/J.1747-0285.2005.00318.X

Postler, T. S., & Ghosh, S. (2017). Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. In *Cell Metabolism* (Vol. 26, Issue 1, pp. 110–130). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.008

Pritchard, A. B., Crean, S., Olsen, I., & Singhrao, S. K. (2017). Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*(OCT). https://doi.org/10.3389/FNAGI.2017.00336

Priyadarshini, M., Kotlo, K. U., Dudeja, P. K., & Layden, B. T. (2018). Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. *Comprehensive Physiology*, *8*(3), 1091. https://doi.org/10.1002/CPHY.C170050

Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S., & Flint, H. J. (1999). Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(12), 5372–5377. https://doi.org/10.1128/aem.65.12.5372-5377.1999

Pugazhenthi, S., Qin, L., & Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1863*(5), 1037–1045. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2016.04.017

Puig, Lutz, Urquhart, Rebel, Zhou, Manocha, Sens, Tuteja, Foster, & Combs. (2015). Overexpression of mutant amyloid-β protein precursor and presenilin 1 modulates enteric nervous system. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *44*(4), 1263–1278. https://doi.org/10.3233/JAD-142259

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., … Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. https://doi.org/10.1038/nature08821

Radulescu, C. I., Garcia-Miralles, M., Sidik, H., Bardile, C. F., Yusof, N. A. B. M., Lee, H. U., Ho,

E. X. P., Chu, C. W., Layton, E., Low, D., De Sessions, P. F., Pettersson, S., Ginhoux, F., & Pouladi, M. A. (2019). Manipulation of microbiota reveals altered callosal myelination and white matter plasticity in a model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, *127*, 65–75. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.02.011

Radulović, M., & Minahan, N. (n.d.). *Tryptophan in Daily Diets and Residents' Mood States at Bayshore Health Center, Alzheimer's Unit*.

Ramai, D., Zakhia, K., Ofosu, A., Ofori, E., & Reddy, M. (2019). Fecal microbiota transplantation: Donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness. In *Annals of Gastroenterology* (Vol. 32, Issue 1, pp. 30–38). Hellenic Society of Gastroenterology. https://doi.org/10.20524/aog.2018.0328

Ramirez, M. J., Lai, M. K. P., Tordera, R. M., & Francis, P. T. (2014). Serotonergic therapies for cognitive symptoms in alzheimer's disease: Rationale and current status. *Drugs*, *74*(7), 729–736. https://doi.org/10.1007/S40265-014-0217-5

Randal Bollinger, R., Everett, M. Lou, Palestrant, D., Love, S. D., Lin, S. S., & Parker, W. (2003). Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*, *109*(4), 580–587. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01700.x

Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: The enteric nervous system in neurological disorders. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 517–528). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.107

Rao, S. S., & Adlard, P. A. (2018). Untangling Tau and Iron: Exploring the Interaction Between Iron and Tau in Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00276

Reau, L., & G, S. (2018). The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *56*(3), 199–208. https://doi.org/10.1007/S12275-018-8024-4

Reiber, H. (2003). Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *21*(3–4), 79–96.

Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 361, Issue 1473, pp. 1545–1564). Royal Society. https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894

Reichenbach, N., Delekate, A., Breithausen, B., Keppler, K., Poll, S., Schulte, T., Peter, J.,

Plescher, M., Hansen, J. N., Blank, N., Keller, A., Fuhrmann, M., Henneberger, C., Halle, A., & Petzold, G. C. (2018). P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer's disease model. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(6), 1649–1663. https://doi.org/10.1084/JEM.20171487

Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Rainey, J. F., III, Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G., & Kashyap, P. C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal*, *29*(4), 1395. https://doi.org/10.1096/FJ.14-259598

Ren, J., & Bertrand, P. P. (2008). Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. In *Purinergic Signalling* (Vol. 4, Issue 3, pp. 255–266). Springer. https://doi.org/10.1007/s11302-007-9088-5

Rezaei Asl, Z., Sepehri, G., & Salami, M. (2019). Probiotic treatment improves the impaired spatial cognitive performance and restores synaptic plasticity in an animal model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, *376*, 112183. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2019.112183

Ridaura, Faith, Rey, Cheng, Duncan, Kau, Griffin, Lombard, Henrissat, Bain, Muehlbauer, Ilkayeva, Semenkovich, Funai, Hayashi, Lyle, Martini, Ursell, Clemente, … Gordon. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6150). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1241214

Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Alexis, E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Luke, K., Clemente, J. C., … Walters, W. A. (2014). Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science*, *341*(6150), 1–22. https://doi.org/10.1126/science.1241214.Cultured

Ries, M., & Sastre, M. (2016). Mechanisms of Aβ Clearance and Degradation by Glial Cells. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *0*(JUN), 160. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2016.00160

Rietdijk, C. D., Perez-Pardo, P., Garssen, J., van Wezel, R. J. A., & Kraneveld, A. D. (2017). Exploring Braak's hypothesis of parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, *8*(FEB), 1. https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00037

Ringot-Destrez, B., D'Alessandro, Z., Lacroix, J.-M., Mercier-Bonin, M., Léonard, R., & Robbe-

Masselot, C. (2018). A Sensitive and Rapid Method to Determin the Adhesion Capacity of Probiotics and Pathogenic Microorganisms to Human Gastrointestinal Mucins. *Microorganisms*, *6*(2), 49. https://doi.org/10.3390/microorganisms6020049

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, *7*(1). https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014

Rio, D. Del, Zimetti, F., Caffarra, P., Tassotti, M., Bernini, F., Brighenti, F., Zini, A., & Zanotti, I. (2017). The gut microbial metabolite trimethylamine-N-oxide is present in human cerebrospinal fluid. *Nutrients*, *9*(10). https://doi.org/10.3390/nu9101053

Robert, A., Schöll, M., & Vogels, T. (2021). Tau Seeding Mouse Models with Patient Brain-Derived Aggregates. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 6132*, *22*(11), 6132. https://doi.org/10.3390/IJMS22116132

Rochais, C., Lecoutey, C., Gaven, F., Giannoni, P., Hamidouche, K., Hedou, D., Dubost, E., Genest, D., Yahiaoui, S., Freret, T., Bouet, V., Dauphin, F., De Oliveira Santos, J. S., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert-Fréon, A., Legay, R., Boulouard, M., Claeysen, S., & Dallemagne, P. (2015). Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT4R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(7), 3172–3187. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00115

Rochais, Lecoutey, Hamidouche, Giannoni, Gaven, Cem, Mignani, Baranger, Freret, Bockaert, Rivera, Boulouard, Dallemagne, & Claeysen. (2020). Donecopride, a Swiss army knife with potential against Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*, *177*(9), 1988–2005. https://doi.org/10.1111/BPH.14964

Rockenstein, McConlogue, Tan, Power, Masliah, & Mucke. (1995). Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(47), 28257–28267. https://doi.org/10.1074/JBC.270.47.28257

Rodríguez, J. J., Noristani, H. N., & Verkhratsky, A. (2012). The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, *99*(1), 15–41. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2012.06.010

Rogier, E. W., Frantz, A. L., Bruno, M. E. C., Wedlund, L., Cohen, D. A., Stromberg, A. J., & Kaetzel, C. S. (2014). Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(8), 3074–3079. https://doi.org/10.1073/pnas.1315792111

Rojas, I. de, Moreno-Grau, S., Tesi, N., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Jansen, I. E., Pedersen, N. L., Stringa, N., Zettergren, A., Hernández, I., Montrreal, L., Antúnez, C., Antonell, A., Tankard, R. M., Bis, J. C., Sims, R., Bellenguez, C., Quintela, I., González-Perez, A., … Ruiz, A. (2021). Common variants in Alzheimer's disease and risk stratification by polygenic risk scores. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-021-22491-8

Romo-Araiza, Gutiérrez-Salmeán, Galván, Hernández-Frausto, Herrera-López, Romo-Parra, García-Contreras, Fernández-Presas, Jasso-Chávez, Borlongan, & Ibarra. (2018). Probiotics and Prebiotics as a Therapeutic Strategy to Improve Memory in a Model of Middle-Aged Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00416

Roshchina, V. V. (2010). Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. In *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health* (pp. 17–52). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5576-0_2

Rothhammer, & Quintana. (2016). Environmental control of autoimmune inflammation in the central nervous system. *Current Opinion in Immunology*, *43*, 46–53. https://doi.org/10.1016/J.COI.2016.09.002

Rothhammer, V., Borucki, D. M., Tjon, E. C., Takenaka, M. C., Chao, C. C., Ardura-Fabregat, A., De Lima, K. A., Gutiérrez-Vázquez, C., Hewson, P., Staszewski, O., Blain, M., Healy, L., Neziraj, T., Borio, M., Wheeler, M., Dragin, L. L., Laplaud, D. A., Antel, J., Alvarez, J. I., … Quintana, F. J. (2018). Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, *557*(7707), 724–728. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x

Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Kenison, J. E., Mayo, L., Chao, C. C., Patel, B., Yan, R., Blain, M., Alvarez, J. I., Kébir, H., Anandasabapathy, N., Izquierdo, G., Jung, S., Obholzer, N., Pochet, N., Clish, C. B., Prinz, M., … Quintana, F. J. (2016). Type i interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*

Medicine, *22*(6), 586–597. https://doi.org/10.1038/nm.4106

Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., & Mazmanian, S. K. (2011). The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, *332*(6032), 974–977. https://doi.org/10.1126/science.1206095

Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 313–323). NIH Public Access. https://doi.org/10.1038/nri2515

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. In *European Journal of Nutrition* (Vol. 57, Issue 1, p. 1). Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8

Roy, T. Le, Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., Philippe, C., Walker, F., Bado, A., Perlemuter, G., Cassard-Doulcier, A.-M., & Gérard, P. (2013). Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*, *62*(12), 1787–1794. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2012-303816

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. In *Virulence* (Vol. 9, Issue 1, pp. 522–554). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372

Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., & Tao, F. (2016). The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12876-016-0498-0

Ruthirakuhan, M., Luedke, A. C., Tam, A., Goel, A., Kurji, A., & Garcia, A. (2012). Use of physical and intellectual activities and socialization in the management of cognitive decline of aging and in dementia: A review. *Journal of Aging Research*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/384875

Ryan, J. M., Quattropani, A., Abd-Elaziz, K., Daas, I. den, Schneider, M., Ousson, S., Neny, M., Sand, A., Hantson, J., Permanne, B., Wiessner, C., & Beher, D. (2018). O1-12-05: PHASE 1 STUDY IN HEALTHY VOLUNTEERS OF THE O-GLCNACASE INHIBITOR ASN120290 AS A NOVEL THERAPY FOR PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY AND RELATED TAUOPATHIES. *Alzheimer's & Dementia*, *14*(7S_Part_4), P251–P251.

https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2018.06.2400

Rynearson, K. D., Ponnusamy, M., Prikhodko, O., Xie, Y., Zhang, C., Nguyen, P., Hug, B., Sawa, M., Becker, A., Spencer, B., Florio, J., Mante, M., Salehi, B., Arias, C., Galasko, D., Head, B. P., Johnson, G., Lin, J. H., Duddy, S. K., … Wagner, S. L. (2021). Preclinical validation of a potent γ-secretase modulator for Alzheimer's disease prevention. *Journal of Experimental Medicine*, *218*(4). https://doi.org/10.1084/JEM.20202560

Sabbagh. (2009). Drug development for Alzheimer's disease: where are we now and where are we headed? In *The American journal of geriatric pharmacotherapy* (Vol. 7, Issue 3, pp. 167–185). Am J Geriatr Pharmacother. https://doi.org/10.1016/J.AMJOPHARM.2009.06.003

Safari, Bruneau, Monnoye, Mariadassou, Philippe, Zatloukal, & Gérard. (2020). Murine Genetic Background Overcomes Gut Microbiota Changes to Explain Metabolic Response to High-Fat Diet. *Nutrients*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/NU12020287

Safieh, M., Korczyn, A. D., & Michaelson, D. M. (2019). ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Medicine 2019 17:1*, *17*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/S12916-019-1299-4

Saito, Matsuba, Mihira, Takano, Nilsson, Itohara, Iwata, & Saido. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 661–663. https://doi.org/10.1038/NN.3697

Saito, Mihira, Matsuba, Sasaguri, Hashimoto, Narasimhan, Zhang, Murayama, Higuchi, Lee, Trojanowski, & Saido. (2019). Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(34), 12754–12765. https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.009487

Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M. F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, *167*(6), 1469-1480.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018

Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, *235*, 34–47.

https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.05.044

Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., Strooper, B. De, Hardy, J., Vassar, R., Winblad, B., & Saido, T. C. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *The EMBO Journal*, *36*(17), 2473–2487. https://doi.org/10.15252/EMBJ.201797397

Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., & De Paepe, M. (2020). New insights into intestinal phages. In *Mucosal Immunology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 205–215). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5

Savica, R., Carlin, J. M., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Ahlskog, J. E., Maraganore, D. M., Bharucha, A. E., & Rocca, W. A. (2009). Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology*, *73*(21), 1752–1758. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c34af5

Savignac, H. M., Kiely, B., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice. *Neurogastroenterology and Motility*, *26*(11), 1615–1627. https://doi.org/10.1111/nmo.12427

Schechter, L., Dawson, L., & Harder, J. (2005). The Potential Utility of 5-HT1A Receptor Antagonists in the Treatment of Cognitive Dysfunction Associated with Alzheimers Disease. *Current Pharmaceutical Design*, *8*(2), 139–145. https://doi.org/10.2174/1381612023396483

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, *30*(3), 350–358. https://doi.org/10.1002/mds.26069

Schoenborn, A. A., von Furstenberg, R. J., Valsaraj, S., Hussain, F. S., Stein, M., Shanahan, M. T., Henning, S. J., & Gulati, A. S. (2019). The enteric microbiota regulates jejunal Paneth cell number and function without impacting intestinal stem cells. *Gut Microbes*, *10*(1), 45–58. https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1474321

Schwarz, E., Maukonen, J., Hyytiäinen, T., Kieseppä, T., Orešič, M., Sabunciyan, S., Mantere, O., Saarela, M., Yolken, R., & Suvisaari, J. (2018). Analysis of microbiota in first episode psychosis identifies preliminary associations with symptom severity and treatment response. *Schizophrenia Research*, *192*, 398–403. https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.04.017

Scott, G. A., Terstege, D. J., Vu, A. P., Law, S., Evans, A., & Epp, J. R. (2020). Disrupted Neurogenesis in Germ-Free Mice: Effects of Age and Sex. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00407

Seifi, M., Brown, J. F., Mills, J., Bhandari, P., Belelli, D., Lambert, J. J., Rudolph, U., & Swinny, J. D. (2014). Molecular and functional diversity of GABA-A receptors in the enteric nervous system of the mouse colon. *Journal of Neuroscience*, *34*(31), 10361–10378. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0441-14.2014

Semar, S., Klotz, M., Letiembre, M., Van Ginneken, C., Braun, A., Jost, V., Bischof, M., Lammers, W. J., Liu, Y., Fassbender, K., Wyss-Coray, T., Kirchhoff, F., & Schäfer, K.-H. (2013). Changes of the Enteric Nervous System in Amyloid-Protein Precursor Transgenic Mice Correlate with Disease Progression. *Journal of Alzheimer's Disease*, *36*, 7–20. https://doi.org/10.3233/JAD-120511

Ser, D., Steinwachs, Gertz, Andrés, Gómez-Carrillo, Medina, Vericat, Redondo, Fleet, & León. (2013). Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *33*(1), 205–215. https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120805

Sergeant, N., Vingtdeux, V., Eddarkaoui, S., Gay, M., Evrard, C., Le Fur, N., Laurent, C., Caillierez, R., Obriot, H., Larchanché, P. E., Farce, A., Coevoet, M., Carato, P., Kouach, M., Descat, A., Dallemagne, P., Buée-Scherrer, V., Blum, D., Hamdane, M., … Melnyk, P. (2019). New piperazine multi-effect drugs prevent neurofibrillary degeneration and amyloid deposition, and preserve memory in animal models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *129*, 217–233. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.03.028

Severance, E. G., Gressitt, K. L., Stallings, C. R., Katsafanas, E., Schweinfurth, L. A., Savage, C. L., Adamos, M. B., Sweeney, K. M., Origoni, A. E., Khushalani, S., Leweke, F. M., Dickerson, F. B., & Yolken, R. H. (2016). Candida albicans exposures, sex specificity and cognitive deficits in schizophrenia and bipolar disorder. *Npj Schizophrenia*, *2*. https://doi.org/10.1038/npjschz.2016.18

Sgritta, M., Dooling, S. W., Buffington, S. A., Momin, E. N., Francis, M. B., Britton, R. A., & Costa-Mattioli, M. (2019). Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*, *101*(2), 246-259.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018

Shahi, S. K., Jensen, S. N., Murra, A. C., Tang, N., Guo, H., Gibson-Corley, K. N., Zhang, J.,

Karandikar, N. J., Murray, J. A., & Mangalam, A. K. (2020). Human Commensal Prevotella histicola Ameliorates Disease as Effectively as Interferon-Beta in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.578648

Shankar, Li, Mehta, Garcia-Munoz, Shepardson, Smith, Brett, Farrell, Rowan, Lemere, Regan, Walsh, Sabatini, & Selkoe. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, *14*(8), 837–842. https://doi.org/10.1038/NM1782

Sharon, G., Cruz, N. J., Kang, D. W., Gandal, M. J., Wang, B., Kim, Y. M., Zink, E. M., Casey, C. P., Taylor, B. C., Lane, C. J., Bramer, L. M., Isern, N. G., Hoyt, D. W., Noecker, C., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Borenstein, E., Jansson, J. K., Knight, R., … Mazmanian, S. K. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*, *177*(6), 1600-1618.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.004

Sheline, Y. I., Snider, B. J., Beer, J. C., Seok, D., Fagan, A. M., Suckow, R. F., Lee, J.-M., Waligorska, T., Korecka, M., Aselcioglu, I., Morris, J. C., Shaw, L. M., & Cirrito, J. R. (2020). Effect of escitalopram dose and treatment duration on CSF Aβ levels in healthy older adults. *Neurology*, *95*(19), e2658–e2665. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010725

Shen, Y., Xu, J., Li, Z., Huang, Y., Yuan, Y., Wang, J., Zhang, M., Hu, S., & Liang, Y. (2018). Analysis of gut microbiota diversity and auxiliary diagnosis as a biomarker in patients with schizophrenia: A cross-sectional study. *Schizophrenia Research*, *197*, 470–477. https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.01.002

Silva, L. G., Ferguson, B. S., Avila, A. S., & Faciola, A. P. (2018). Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Animal Science*, *96*(12), 5244–5252. https://doi.org/10.1093/jas/sky373

Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., & Ganapathy, V. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, *40*(1), 128–139. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007

Siopi, E., Saha, S., Moigneu, C., Bigot, M., & Lledo, P.-M. (2019). Gut microbiota requires vagus nerve integrity to promote depression. *BioRxiv*. https://doi.org/10.1101/547778

Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 4, pp. 1417–1435). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu5041417

Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. In *Dialogues in Clinical Neuroscience* (Vol. 8, Issue 4, pp. 383–395). Les Laboratoires Servier. https://doi.org/10.31887/dcns.2006.8.4/ssmith

Snoeck, V., Goddeeris, B., & Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. In *Microbes and Infection* (Vol. 7, Issues 7–8, pp. 997–1004). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003

Soeda, Saito, Maeda, Ishida, Nakamura, Kojima, & Takashima. (2019). Methylene Blue Inhibits Formation of Tau Fibrils but not of Granular Tau Oligomers: A Plausible Key to Understanding Failure of a Clinical Trial for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *68*(4), 1677–1686. https://doi.org/10.3233/JAD-181001

Sofi, M. H., Gudi, R., Karumuthil-Melethil, S., Perez, N., Johnson, B. M., & Vasu, C. (2014). PH of drinking water influences the composition of gut microbiome and type 1 diabetes incidence. *Diabetes*, *63*(2), 632–644. https://doi.org/10.2337/db13-0981

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(43), 16731–16736. https://doi.org/10.1073/PNAS.0804812105

Sotiropoulos, I., Galas, M.-C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., Blum, D., Sayas, C. L., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Spillantini, M. G., Sousa, N., Avila, J., Medina, M., Mudher, A., & Buee, L. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1), 91. https://doi.org/10.1186/S40478-017-0489-6

Steel, & Eslick. (2015). Herpes Viruses Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *47*(2), 351–364. https://doi.org/10.3233/JAD-140822

Steinberg, B. E., Silverman, H. A., Robbiati, S., Gunasekaran, M. K., Tsaava, T., Battinelli, E., Stiegler, A., Bouton, C. E., Chavan, S. S., Tracey, K. J., & Huerta, P. T. (2016). Cytokine-specific Neurograms in the Sensory Vagus Nerve. *Bioelectronic Medicine*, *3*(1), 7–17. https://doi.org/10.15424/bioelectronmed.2016.00007

Stöhr, Watts, Mensinger, Oehler, Grillo, DeArmond, Prusiner, & Giles. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (Aβ) prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(27), 11025–11030. https://doi.org/10.1073/PNAS.1206555109

Stoye, N. M., Guilherme, M. dos S., & Endres, K. (2020). Alzheimer's disease in the gut—Major changes in the gut of 5xFAD model mice with ApoA1 as potential key player. *The FASEB Journal*, *34*(9), 11883–11899. https://doi.org/10.1096/FJ.201903128RR

Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. In *Brain Research* (Vol. 1693, Issue Pt B, pp. 128–133). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015

Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Renzi, D., Calabrò, A., & De Filippo, C. (2017). New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1

Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, *1*(4), 1810–1819. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.285

Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006b). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, *1*(4), 1952–1960. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.284

Stroup. (1962). Amniotic fluid infection and the intact fetal membrane. *Obstetrics and Gynecology*, *19*, 736–739. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13917871

Sturdevant, Joseph, Schnell, Price, Swanstrom, & Spudich. (2015). Compartmentalized replication of R5 T cell-tropic HIV-1 in the central nervous system early in the course of infection. *PLoS Pathogens*, *11*(3), 1–24. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004720

Stuve, O., Weideman, R. A., McMahan, D. M., Jacob, D. A., & Little, B. B. (2020). Diclofenac reduces the risk of Alzheimer's disease: a pilot analysis of NSAIDs in two US veteran

populations. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *13*. https://doi.org/10.1177/1756286420935676

Sudo, N. (2019). Biogenic Amines: Signals Between Commensal Microbiota and Gut Physiology. *Frontiers in Endocrinology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00504

Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., Kubo, C., & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *Journal of Physiology*, *558*(1), 263–275. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388

Sun, J., Yuan, B., Wu, Y., Gong, Y., Guo, W., Fu, S., Luan, Y., & Wang, W. (2020). Sodium Butyrate Protects N2a Cells against A β Toxicity in Vitro. *Mediators of Inflammation*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/7605160

Sun, M. F., Zhu, Y. L., Zhou, Z. L., Jia, X. B., Xu, Y. Da, Yang, Q., Cui, C., & Shen, Y. Q. (2018). Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF-α signaling pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, *70*, 48–60. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.005

Sun, Xu, Ling, Wang, Gong, Yang, Ye, Ye, Wei, Song, Chen, & Liu. (2019). Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Translational Psychiatry*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/S41398-019-0525-3

Sun, Y., Sommerville, N. R., Liu, J. Y. H., Ngan, M. P., Poon, D., Ponomarev, E. D., Lu, Z., Kung, J. S. C., & Rudd, J. A. (2020). Intra-gastrointestinal amyloid-β1–42 oligomers perturb enteric function and induce Alzheimer's disease pathology. *The Journal of Physiology*, *598*(19), 4209–4223. https://doi.org/10.1113/JP279919

Sutoyo, D. A., Atmaka, D. R., & G. B. Sidabutar, L. M. (2020). DIETARY FACTORS AFFECTING FIRMICUTES AND BACTEROIDETES RATIO IN SOLVING OBESITY PROBLEM: A LITERATURE REVIEW. *Media Gizi Indonesia*, *15*(2), 94. https://doi.org/10.20473/MGI.V15I2.94-109

Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neurology*, *14*(3), 133. https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2017.188

Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, *9*(APR), 114. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114

Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., & Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics*, *5*(FEB), 81. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00081

Takahashi, J. A., Sande, D., da Silva Lima, G., Moura, M. A. F. e., & Lima, M. T. N. S. (2019). Fungal Metabolites as Promising New Drug Leads for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Studies in Natural Products Chemistry*, *62*, 1–39. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64185-4.00001-0

Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., & Dobrogosz, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by Lactobacillus reuteri. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *32*(12), 1854–1858. https://doi.org/10.1128/AAC.32.12.1854

Taleb, S. (2019). Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2113. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02113

Tamanai-Shacoori, I, S., L, B., O, L., V, M., SB, F., M, B.-M., & A, J.-G. (2017). Roseburia spp.: a marker of health? *Future Microbiology*, *12*(2), 157–170. https://doi.org/10.2217/FMB-2016-0130

Tekieli, L.-S., Radens, C. M., Williams, B. L., N Gabriela Gonzalez-Perez, E. S., & Hicks, A. L. (2016). *Microbiome and Antiviral Immunity Development of the Neonatal Intestinal Maternal Antibiotic Treatment Impacts*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502322

Telano, L. N., & Baker, S. (2018). Physiology, Cerebral Spinal Fluid (CSF). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085549

Tesseur, Pimenova, Lo, Ciesielska, Lichtenthaler, Maeyer, D., Schuurkes, D'Hooge, & Strooper, D. (2013). Chronic 5-HT4 receptor activation decreases Aβ production and deposition in hAPP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, *34*(7), 1779–1789. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.01.020

Tetz, G., Pinho, M., Pritzkow, S., Mendez, N., Soto, C., & Tetz, V. (2020). Bacterial DNA promotes Tau aggregation. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59364-x

Thal, U, R., M, O., & H, B. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, *58*(12), 1791–1800. https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791

Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 29615.

https://doi.org/10.1074/JBC.R800019200

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., … Garel, S. (2018). Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell*, *172*(3), 500-516.e16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.042

Tippmann, Hundt, Schneider, Endres, & Fahrenholz. (2009). Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(6), 1643–1654. https://doi.org/10.1096/FJ.08-121392

Travagli, R. A. (2012). Neurones in the dorsal vagal complex may be more tasteful than expected. *The Journal of Physiology*, *590*(16), 3637–3638. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.237750

Tremlett, H., & Waubant, E. (2018). The Gut Microbiota and Pediatric Multiple Sclerosis: Recent Findings. *Neurotherapeutics*, *15*(1), 102–108. https://doi.org/10.1007/s13311-017-0574-3

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, *444*(7122), 1027–1031. https://doi.org/10.1038/nature05414

Ubeda, C., & Pamer, E. G. (2012). Antibiotics, microbiota, and immune defense. In *Trends in Immunology* (Vol. 33, Issue 9, pp. 459–466). NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.05.003

Unger, M. M., Spiegel, J., Dillmann, K. U., Grundmann, D., Philippeit, H., Bürmann, J., Faßbender, K., Schwiertz, A., & Schäfer, K. H. (2016). Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism and Related Disorders*, *32*, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019

Valeri, F., & Endres, K. (2021). How biological sex of the host shapes its gut microbiota. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *61*, 100912. https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2021.100912

Valko, H, M., & MT, C. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(10), 1161–1208. https://doi.org/10.2174/0929867053764635

Vallino, A., Dos Santos, A., Mathé, C. V., Garcia, A., Morille, J., Dugast, E., Shah, S. P., Héry-Arnaud, G., Guilloux, C. A., Gleeson, P. J., Monteiro, R. C., Soulillou, J. P., Harb, J., Bigot-Corbel, E., Michel, L., Wiertlewski, S., Nicot, A. B., Laplaud, D. A., & Berthelot, L. (2020). Gut bacteria Akkermansia elicit a specific IgG response in CSF of patients with MS. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *7*(3). https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000688

Van der Burg, J. M. M., Gardiner, S. L., Ludolph, A. C., Landwehrmeyer, G. B., Roos, R. A. C., & Aziz, N. A. (2017). Body weight is a robust predictor of clinical progression in Huntington disease. *Annals of Neurology*, *82*(3), 479–483. https://doi.org/10.1002/ana.25007

Van der Burg, J. M. M., Winqvist, A., Aziz, N. A., Maat-Schieman, M. L. C., Roos, R. A. C., Bates, G. P., Brundin, P., Björkqvist, M., & Wierup, N. (2011). Gastrointestinal dysfunction contributes to weight loss in Huntington's disease mice. *Neurobiology of Disease*, *44*(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.05.006

van der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, *71*(1), 241–260. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145

Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 60, pp. 1–12). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010

Varela, R. B., Valvassori, S. S., Lopes-Borges, J., Mariot, E., Dal-Pont, G. C., Amboni, R. T., Bianchini, G., & Quevedo, J. (2015). Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *Journal of Psychiatric Research*, *61*, 114–121. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.11.003

Vargas-Caraveo, A., Sayd, A., Maus, S. R., Caso, J. R., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., & Leza, J. C. (2017). Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13302-6

Varghese, F. P., & Brown, E. S. (2001). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: A brief primer for primary care physicians. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, *3*(4), 151–155. https://doi.org/10.4088/pcc.v03n0401

Varma, V. R., Wang, Y., An, Y., Varma, S., Bilgel, M., Doshi, J., Legido-Quigley, C., Delgado, J. C., Oommen, A. M., Roberts, J. A., Wong, D. F., Davatzikos, C., Resnick, S. M., Troncoso, J. C., Pletnikova, O., O'Brien, R., Hak, E., Baak, B. N., Pfeiffer, R., … Thambisetty, M. (2021). Bile acid synthesis, modulation, and dementia: A metabolomic, transcriptomic, and pharmacoepidemiologic study. *PLOS Medicine*, *18*(5), e1003615. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1003615

Vassar, Bennett, Babu-Khan, Kahn, Mendiaz, Denis, Teplow, Ross, Amarante, Loeloff, Luo, Fisher, Fuller, Edenson, Lile, Jarosinski, Biere, Curran, Burgess, … Citron. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N.Y.)*, *286*(5440), 735–741. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.286.5440.735

Vautheny, A., Duwat, C., Aurégan, G., Joséphine, C., Hérard, A. S., Jan, C., Mitja, J., Gipchtein, P., Gaillard, M. C., Buée, L., Blum, D., Hantraye, P., Bonvento, G., Brouillet, E., Cambon, K., & Bemelmans, A. P. (2021). THY-Tau22 mouse model accumulates more tauopathy at late stage of the disease in response to microglia deactivation through TREM2 deficiency. *Neurobiology of Disease*, *155*, 105398. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2021.105398

Viswanathan, V. K. (2013). Sensing bacteria, without bitterness? In *Gut Microbes* (Vol. 4, Issue 2, pp. 91–93). Taylor & Francis. https://doi.org/10.4161/gmic.23776

Vogt, Kerby, Dill-McFarland, Harding, Merluzzi, Johnson, Carlsson, Asthana, Zetterberg, Blennow, Bendlin, & Rey. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-017-13601-Y

Vogt, N. M., Romano, K. A., Darst, B. F., Engelman, C. D., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Blennow, K., Zetterberg, H., Bendlin, B. B., & Rey, F. E. (n.d.). *The gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide is elevated in Alzheimer's disease*. https://doi.org/10.1186/s13195-018-0451-2

Waise, T. M. Z., Dranse, H. J., & Lam, T. K. T. (2018). The metabolic role of vagal afferent innervation. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 625–636). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0062-1

Walker, & M, J. (2015). Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept. *Annual Review of Neuroscience*, *38*, 87–103. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-071714-033828

Wang, Cella, Mallinson, Ulrich, Young, Robinette, Gilfillan, Krishnan, Sudhakar, Zinselmeyer,

Holtzman, Cirrito, & Colonna. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, *160*(6), 1061–1071. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.01.049

Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., & Ling, L. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 22021–22028. https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200

Wang, S., Xiao, Y., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 66, p. 103838). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103838

Wang, X., Heazlewood, S. P., Krause, D. O., & Florin, T. H. J. (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(3), 508–520. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02005.x

Wang, Y., Shi, Y., & Wei, H. (2017). Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease: A Target for New Drug Development. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, *7*(5). https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000374

Wang, Y., Tong, Q., Ma, S.-R., Zhao, Z.-X., Pan, L.-B., Cong, L., Han, P., Peng, R., Yu, H., Lin, Y., Gao, T.-L., Shou, J.-W., Li, X.-Y., Zhang, X.-F., Zhang, Z.-W., Fu, J., Wen, B.-Y., Yu, J.-B., Cao, X., & Jiang, J.-D. (2021). Oral berberine improves brain dopa/dopamine levels to ameliorate Parkinson's disease by regulating gut microbiota. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 77. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00456-5

Watamura, N. (2020). Human MAPT knock-in mice that harbor familial tauopathy-causing mutations. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(S3), e041684. https://doi.org/10.1002/ALZ.041684

Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, *56*(11), 1733–1741. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405

Wei, W., Norton, D. D., Wang, X., & Kusiak, J. W. (2002). Aβ 17–42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain*, *125*(9), 2036–2043. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWF205

Weidemann, ‡, Simone Eggert, ‡, Friedrich B. M. Reinhard, ‡, Markus Vogel, ‡, Krzysztof

Paliga, §, Gottfried Baier, ‖, Colin L. Masters, ⊥, Konrad Beyreuther, ‡ and, & Geneviève Evin*, ⊥. (2002). A Novel ε-Cleavage within the Transmembrane Domain of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein Demonstrates Homology with Notch Processing†. *Biochemistry*, *41*(8), 2825–2835. https://doi.org/10.1021/BI015794O

Weiner, Sadowsky, Saxton, Hofbauer, Graham, Yu, Li, Hsu, Suhy, Fridman, & Perhach. (2011). Magnetic resonance imaging and neuropsychological results from a trial of memantine in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, *7*(4), 425–435. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2010.09.003

Weinstock, M. (2012). Selectivity of Cholinesterase Inhibition. *CNS Drugs 1999 12:4*, *12*(4), 307–323. https://doi.org/10.2165/00023210-199912040-00005

Whiley, L., Chappell, K. E., D'Hondt, E., Lewis, M. R., Jiménez, B., Snowden, S. G., Soininen, H., Kłoszewska, I., Mecocci, P., Tsolaki, M., Vellas, B., Swann, J. R., Hye, A., Lovestone, S., Legido-Quigley, C., Holmes, E., & consortium, on behalf of A. (2021). Metabolic phenotyping reveals a reduction in the bioavailability of serotonin and kynurenine pathway metabolites in both the urine and serum of individuals living with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S13195-020-00741-Z

Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(10), 3698–3703. https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106

Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D. B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M. T., Thal, D. R., Giedraitis, V., … Haass, C. (2015). η-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature 2015 526:7573*, *526*(7573), 443–447. https://doi.org/10.1038/nature14864

Williams, B. B., Van Benschoten, A. H., Cimermancic, P., Donia, M. S., Zimmermann, M., Taketani, M., Ishihara, A., Kashyap, P. C., Fraser, J. S., & Fischbach, M. A. (2014). Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host and Microbe*, *16*(4), 495–503. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.001

Winzell, M. S., & Ahrén, B. (2004). The High-Fat Diet–Fed Mouse. *Diabetes*, *53*(suppl 3), S215–

S219. https://doi.org/10.2337/DIABETES.53.SUPPL_3.S215

Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., … Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D608–D617. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(12), 4576–4579. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576

Wolf, K. J., Daft, J. G., Tanner, S. M., Hartmann, R., Khafipour, E., & Lorenz, R. G. (2014). Consumption of Acidic Water Alters the Gut Microbiome and Decreases the Risk of Diabetes in NOD Mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *62*(4), 237–250. https://doi.org/10.1369/0022155413519650

Wong, A., Ye, M., Levy, A., Rothstein, J., Bergles, D., & Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in Neuroengineering*, *0*(JUL), 7. https://doi.org/10.3389/FNENG.2013.00007

Wong, B. X., Tsatsanis, A., Lim, L. Q., Adlard, P. A., Bush, A. I., & Duce, J. A. (2014). β-Amyloid Precursor Protein Does Not Possess Ferroxidase Activity but Does Stabilize the Cell Surface Ferrous Iron Exporter Ferroportin. *PLOS ONE*, *9*(12), e114174. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114174

Wood, I. C. (2018). The Contribution and Therapeutic Potential of Epigenetic Modifications in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *0*(SEP), 649. https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00649

Wu, L., Han, Y., Zheng, Z., Peng, G., Liu, P., Yue, S., Zhu, S., Chen, J., Lv, H., Shao, L., Sheng, Y., Wang, Y., Li, L., Li, L., & Wang, B. (2021). Altered Gut Microbial Metabolites in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Signals in Host–Microbe Interplay. *Nutrients*, *13*(1), 1–15. https://doi.org/10.3390/NU13010228

Wu, W., Sun, M., Chen, F., Cao, A. T., Liu, H., Zhao, Y., Huang, X., Xiao, Y., Yao, S., Zhao, Q., Liu, Z., & Cong, Y. (2017). Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunology*, *10*(4), 946–956. https://doi.org/10.1038/mi.2016.114

Wu, X., Lv, Y. G., Du, Y. F., Chen, F., Reed, M. N., Hu, M., Suppiramaniam, V., Tang, S. S., & Hong, H. (2018). Neuroprotective effects of INT-777 against Aβ1–42-induced cognitive impairment, neuroinflammation, apoptosis, and synaptic dysfunction in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *73*, 533–545. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.06.018

Xi, J., Ding, D., Zhu, H., Wang, R., Su, F., Wu, W., Xiao, Z., Liang, X., Zhao, Q., Hong, Z., Fu, H., & Xiao, Q. (2021). Disturbed microbial ecology in Alzheimer's disease: evidence from the gut microbiota and fecal metabolome. *BMC Microbiology*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/S12866-021-02286-Z

Xiang, Werner, Bohrmann, Liesz, Mazaheri, Capell, Feederle, Knuesel, Kleinberger, & Haass. (2016). TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(9), 992–1004. https://doi.org/10.15252/EMMM.201606370

Xiao, Chan, Wang, Hong, Wang, Kuang, He, Pan, Zhou, Ji, Wang, Cheng, Peng, Ye, Wang, Wu, Qu, Chen, Li, … Zhang. (2021). A 36-week multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, phase 3 clinical trial of sodium oligomannate for mild-to-moderate Alzheimer's dementia. *Alzheimer's Research & Therapy*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S13195-021-00795-7

Xiong, T, M., J, L., & H, Z. (2021). The Potential of Neurofilament Light as a Biomarker in Alzheimer's Disease. *European Neurology*, *84*(1), 6–15. https://doi.org/10.1159/000513008

Xu, L., Shao, C., Li, G., Shan, A., Chou, S., Wang, J., Ma, Q., & Dong, N. (2020). Conversion of Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides into Species-Specific Antimicrobials Capable of Precisely Targeting Pathogenic Bacteria. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58014-6

Xu, Wang, Tan, Li, Zhang, & Feng. (2020). Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 219. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00219

Yan, F., Chen, Y., Li, M., Wang, Y., Zhang, W., Chen, X., & Ye, Q. (2018). Gastrointestinal nervous system α-synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine*, *97*(28). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011337

Yan, J., & Charles, J. F. (2018). Gut Microbiota and IGF-1. In *Calcified Tissue International* (Vol. 102, Issue 4, pp. 406–414). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s00223-018-

0395-3

Yang, & K, Q. (2017). Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *18*(7), 452–465. https://doi.org/10.1038/NRM.2017.22

Yang, X., Xie, L., Li, Y., & Wei, C. (2009). More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: Estimating gene numbers inside a human body. *PLoS ONE*, *4*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006074

Yang, Zhang, Wang, Wu, Lou, & Qi. (2013). Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration. *International Journal of Pharmaceutics*, *452*(1–2), 344–354. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.05.009

Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, *161*(2), 264–276. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., … Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. In *Nature* (Vol. 486, Issue 7402, pp. 222–227). NIH Public Access. https://doi.org/10.1038/nature11053

Yu, Y.-B., & Li, Y.-Q. (2014). Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(32), 11273. https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I32.11273

Yu, Y., Yang, W., Li, Y., & Cong, Y. (2020). Enteroendocrine Cells: Sensing Gut Microbiota and Regulating Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, *26*(1), 11–20. https://doi.org/10.1093/ibd/izz217

Zammit, Laymon, Betthauser, Cody, Tudorascu, Minhas, Sabbagh, Johnson, Zaman, Mathis, Klunk, Handen, Cohen, & Christian. (2020). Amyloid accumulation in Down syndrome measured with amyloid load. *Alzheimer's & Dementia (Amsterdam, Netherlands)*, *12*(1). https://doi.org/10.1002/DAD2.12020

Zeng, L., Zeng, B., Wang, H., Li, B., Huo, R., Zheng, P., Zhang, X., Du, X., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zhou, C., Chen, J., Li, W., Guo, J., Wei, H., & Xie, P. (2016). Microbiota modulates behavior

and protein kinase c mediated cAMP response element-binding protein signaling. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/srep29998

Zhan, Stamova, Jin, DeCarli, Phinney, & Sharp. (2016). Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*, *87*(22), 2324–2332. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003391

Zhang, D.-M., Ye, J.-X., Mu, J.-S., & Cui, X.-P. (2016). Efficacy of Vitamin B Supplementation on Cognition in Elderly Patients With Cognitive-Related Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1177/0891988716673466*, *30*(1), 50–59. https://doi.org/10.1177/0891988716673466

Zhang, F., Luo, W., Shi, Y., Fan, Z., & Ji, G. (2012). Should We Standardize the 1,700-Year-Old Fecal Microbiota Transplantation? *American Journal of Gastroenterology*, *107*(11), 1755. https://doi.org/10.1038/ajg.2012.251

Zhang, F., Yue, L., Fang, X., Wang, G., Li, C., Sun, X., Jia, X., Yang, J., Song, J., Zhang, Y., Guo, C., Ma, G., Sang, M., Chen, F., & Wang, P. (2020). Altered gut microbiota in Parkinson's disease patients/healthy spouses and its association with clinical features. *Parkinsonism and Related Disorders*, *81*, 84–88. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.10.034

Zhang, O, G., Y, H., G, W., & HY, M. (2018). Amyloid-β Induces AMPA Receptor Ubiquitination and Degradation in Primary Neurons and Human Brains of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *62*(4), 1789–1801. https://doi.org/10.3233/JAD-170879

Zhang, P. (2011). Glucose Tolerance Test in Mice. *BIO-PROTOCOL*, *1*(19). https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.159

Zhang, Song, Liu, Kang, Duong, Seyfried, Cao, Cheng, Sun, Yu, Jia, Levey, & Ye. (2015). Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *6*. https://doi.org/10.1038/NCOMMS9762

Zhang, X., Cui, J., Tan, Z., Jiang, C., & Fogel, R. (2003). The central nucleus of the amygdala modulates gut-related neurons in the dorsal vagal complex in rats. *Journal of Physiology*, *553*(3), 1005–1018. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045906

Zhang, X., Li, Y., Xu, H., & Zhang, Y. (2014). The γ-secretase complex: from structure to function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(DEC). https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00427

Zhang, Y., Huang, R., Cheng, M., Wang, L., Chao, J., Li, J., Zheng, P., Xie, P., Zhang, Z., & Yao, H.

(2019). Gut microbiota from NLRP3-deficient mice ameliorates depressive-like behaviors by regulating astrocyte dysfunction via circHIPK2. *Microbiome*, *7*(1). https://doi.org/10.1186/s40168-019-0733-3

Zhang, Y, Z., J, Z., & G, Y. (2020). Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Activation: Its Role in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, *45*(11), 2560–2572. https://doi.org/10.1007/S11064-020-03121-Z

Zhao, H., Gao, X., Xi, L., Shi, Y., Peng, L., Wang, C., Zou, L., & Yang, Y. (2019). Mo1667 FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION FOR CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER. *Gastrointestinal Endoscopy*, *89*(6), AB512–AB513. https://doi.org/10.1016/j.gie.2019.03.857

Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y., & Wang, C. (2020). Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00137

Zhao, R. H., Zheng, P. Y., Liu, S. M., Tang, Y. C., Li, E. Y., Sun, Z. Y., & Jiang, M. M. (2019). Correlation between gut microbiota and behavior symptoms in children with autism spectrum disorder. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, *21*(7), 663–669. https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2019.07.009

Zhao, R., Wang, H., Qiao, C., & Zhao, K. (2018). Vitamin B2 blocks development of Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mice via anti-oxidative mechanism. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(6), 1049–1054. https://doi.org/10.4314/TJPR.V17I6.10

Zhao, V, J., & WJ, L. (2017). Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(JUL). https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00318

Zheng, P., Zeng, B., Liu, M., Chen, J., Pan, J., Han, Y., Liu, Y., Cheng, K., Zhou, C., Wang, H., Zhou, X., Gui, S., Perry, S. W., Wong, M. L., Licinio, J., Wei, H., & Xie, P. (2019). The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. *Science Advances*, *5*(2), eaau8317. https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8317

Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., Zhang, X., Yang, D., Yang, Y., Meng, H., Li, W., Melgiri, N. D., Licinio, J., Wei, H., & Xie, P. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway

mediated by the host's metabolism. *Molecular Psychiatry*, *21*(6), 786–796. https://doi.org/10.1038/mp.2016.44

Zhou, Q., & Verne, G. N. (2008). NMDA Receptors and Colitis: Basic Science and Clinical Implications. *Reviews in Analgesia*, *10*(1), 33.

Zhu, F., Ju, Y., Wang, W., Wang, Q., Guo, R., Ma, Q., Sun, Q., Fan, Y., Xie, Y., Yang, Z., Jie, Z., Zhao, B., Xiao, L., Yang, L., Zhang, T., Feng, J., Guo, L., He, X., Chen, Y., … Ma, X. (2020). Metagenome-wide association of gut microbiome features for schizophrenia. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-15457-9

Zhuang, Z.-Q., Shen, L.-L., Li, W.-W., Fu, X., Zeng, F., Gui, L., Lü, Y., Cai, M., Zhu, C., Tan, Y.-L., Zheng, P., Li, H.-Y., Zhu, J., Zhou, H.-D., Bu, X.-L., & Wang, Y.-J. (2018). Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *63*(4), 1337–1346. https://doi.org/10.3233/JAD-180176

Zhuang, Z., Gao, M., Yang, R., Liu, Z., Cao, W., & Huang, T. (2021). Causal relationships between gut metabolites and Alzheimer's disease: a bidirectional Mendelian randomization study. *Neurobiology of Aging*, *100*, 119.e15-119.e18. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2020.10.022

Zinöcker, M. K., & Lindseth, I. A. (2018). The Western Diet–Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients*, *10*(3). https://doi.org/10.3390/NU10030365

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(10), 3854–3859. https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3854-3859.1998

Zoetendal, E. G., Von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(7), 3401–3407. https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3401-3407.2002

Zussy, Brureau, Delair, Marchal, Keller, Ixart, Naert, Meunier, Chevallier, Maurice, & Givalois. (2011). Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats. *The American Journal of Pathology*, *179*(1), 315–334. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.03.021

Caractérisation et modulation du microbiote intestinal dans le contexte de la maladie d'Alzheimer : vers une nouvelle piste thérapeutique

La maladie d'Alzheimer, première cause de démence au niveau mondial, demeure incurable. Cette pathologie neurodégénérative est caractérisée au niveau cérébral par deux lésions majeures : l'agrégation extracellulaire de peptides β-amyloïdes et l'agrégation intraneuronale de protéines Tau anormalement phosphorylées. Le microbiote intestinal, qui a récemment émergé comme un acteur clé dans le fonctionnement du système nerveux central, *via* un axe appelé l'axe microbiote-intestinal-cerveau, serait également impliqué dans le développement et la progression de la maladie d'Alzheimer. Des études sur des modèles murins précliniques ont ainsi démontré une corrélation entre la composition du microbiote intestinal et l'amyloïdose cérébrale. L'objectif de cette thèse de doctorat a été de moduler la composition du microbiote intestinal du modèle murin d'amyloïdose 5XFAD afin d'évaluer le rôle de la composante bactérienne dans le développement de la pathologie. Cette modulation du microbiote a été réalisée par des approches classiques utilisant des modulateurs microbiens tels que les antibiotiques et les prébiotiques, et par des approches de transplantation de microbiote fécal. En parallèle, une approche thérapeutique visant au développement de ligands multi-cibles a récemment émergé, en réponse à la complexité et à l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. De tels composés ont été conçus au sein de l'équipe et ont fait l'objet d'une évaluation *in vivo*. Les résultats de ce travail de thèse ont permis de démontrer d'une part les effets prometteurs d'une molécule à triple action à ralentir l'apparition des altérations cognitives et neuropathologiques dans le modèle 5XFAD, et d'autre part que la modulation du microbiote intestinal dans ce modèle par des composés pharmacologiques, des modulateurs microbiens classiques ou par transplantation fécale peut offrir de nouvelles pistes thérapeutiques afin de traiter la maladie d'Alzheimer.

Mots-clés : Maladie d'Alzheimer, Pathologie amyloïde, Microbiote intestinal, Pharmacologie, Antibiotiques, Transplantation de microbiote fécal

Characterisation and modulation of the intestinal microbiota in the context of Alzheimer's disease: towards a new therapeutic strategy

Alzheimer's disease is the first common form of dementia worldwide. This neurodegenerative pathology is characterized by two main features in the brain: the extracellular aggregation of β-amyloid peptides, and the intraneuronal aggregation of abnormally phosphorylated Tau proteins. The gut microbiota, that has recently emerged has a key player in the function of the central nervous system, through the so-called gut-brain-axis, may be also implicated in the development and progression of Alzheimer's disease. Studies on preclinical murine models have demonstrated a correlation between the composition of the gut microbiota and the brain amyloidosis. The objective of this thesis was to modulate the composition of the intestinal microbiota in the 5XFAD mouse model of amyloidosis, in order to evaluate the role of the bacterial component in the development of the pathology. This modulation of the microbiota has been carried out by classical microbial modulators such as antibiotics and prebiotics, and by gut microbiota transplantations. In parallel, therapeutic approaches aiming at developing multi-target directed ligands have emerged as Alzheimer's disease is a complex and heterogeneous disease. Such compounds have been synthetized within the team and have been the subject of *in vivo* evaluations. This thesis work has demonstrated on the one hand the promising results of a triple-activity compound to slow down the cognitive impairments and pathological alterations of the 5XFAD model, and on the other hand that the modulation of the gut microbiota of this model through pharmacological compounds, classical microbial modulators or fecal microbiota transplantation could offer new therapeutic avenues to treat Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease, Amyloid pathology, Intestinal microbiota, Pharmacology, Antibiotics, Fecal microbiota transplantation