



# **La thermorégulation comme cible thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer**

**Thèse**

**Marine Tournissac**

**Doctorat en sciences pharmaceutiques**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

# **La thermorégulation comme cible thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer**

**Thèse**

**Marine Tournissac**

Sous la direction de :

**Frédéric Calon, directeur de recherche**

## Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se manifeste par l'apparition progressive de troubles de la mémoire. Le nombre de personnes affectées par la maladie est en constante hausse, mais il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif pour la MA. L'âge avancé est le principal facteur de risque de la MA et est associé à un déficit de thermorégulation. De précédentes études animales montrent d'ailleurs que l'hypothermie augmente la phosphorylation de la protéine tau, l'un des principaux marqueurs neuropathologiques de la MA. La souris triple transgénique (3xTg-AD), un modèle murin de la MA, présente un déficit de thermorégulation qui s'installe progressivement avec le vieillissement et l'apparition de la neuropathologie. Une exposition aigüe au froid aggrave l'hyperphosphorylation de tau dans le cerveau de ces souris, tandis que les placer à une température thermoneutre (28°C) diminue leurs déficits de mémoire et leur pathologie amyloïde. Le tissu adipeux brun (TAB) est le principal siège de la thermogenèse chez les mammifères. La stimulation de son activité, par des expositions au froid ou l'administration d'agonistes des récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques (R $\beta_3$ A), permet de diminuer les altérations métaboliques périphériques. Puisque les maladies métaboliques sont des facteurs de risques importants pour la MA, et qu'un déficit de thermorégulation semble aggraver la MA, nous avons émis l'hypothèse que la stimulation du TAB pourrait être bénéfique pour la MA en corrigeant les déficits de thermorégulation et les troubles métaboliques.

L'objectif de cette thèse était de déterminer si la stimulation de la thermogenèse du TAB permettait de diminuer la neuropathologie et les déficits comportementaux dans un modèle murin de la MA, la souris 3xTg-AD.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'âge avancé potentialisait la phosphorylation de tau induite par une exposition aigüe au froid. Dans un second temps, nous avons montré que de courtes expositions répétées au froid permettaient d'augmenter la capacité de thermogenèse du TAB et de réduire l'intolérance au glucose des souris 3xTg-AD âgées. Une meilleure thermorégulation conférait une protection contre la phosphorylation de tau induite par une exposition aigüe au froid. De plus, nous avons observé une corrélation négative entre les niveaux du facteur de croissance des fibroblastes 21 (FGF21) et la phosphorylation de tau dans l'hippocampe, suggérant que cette hormone produite par le TAB est impliquée dans la neuroprotection contre une exposition aigüe au froid. Finalement, nous avons investigué l'effet d'un agoniste des R $\beta_3$ A sur la neuropathologie et la mémoire des souris 3xTg-AD âgées. Cette approche pharmacologique a permis d'améliorer la tolérance au glucose et d'augmenter la thermogenèse du TAB des souris 3xTg-AD et NonTg âgées de 16 mois. Le traitement a renversé le déficit de mémoire de reconnaissance et a diminué le ratio de peptides A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 insolubles dans l'hippocampe des souris transgéniques, sans moduler la phosphorylation de la protéine tau.

Ces résultats montrent que les interventions visant à stimuler la thermogénèse permettent de diminuer les désordres métaboliques et d'altérer la neuropathologie et les déficits comportementaux de la MA dans un modèle murin. Ainsi, nos résultats mettent en lumière la thermorégulation comme une nouvelle cible thérapeutique et ouvrent la voie à de nouvelles stratégies pour cette maladie.



## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive loss of memory. The number of people affected by the disease is constantly increasing, but there is currently no cure for AD. Aging, the main risk factor for AD, is also associated with a thermoregulatory deficit. Previous animal studies have shown that hypothermia increases the phosphorylation of the protein tau, one of the main neuropathological markers of AD. The transgenic triple mouse (3xTg-AD), a mouse model of AD neuropathology, develops thermoregulatory deficits along with the progression of the neuropathology. Acute cold exposure exacerbates tau hyperphosphorylation in the brain of 3xTg-AD mice, while exposing them to a thermoneutral environment (28°C) alleviates their memory deficits and amyloid pathology. Brown adipose tissue (BAT) is the main site of thermogenesis in mammals. The stimulation of its activity, by cold exposures or the administration of  $\beta$ 3 adrenergic receptor agonists ( $\beta$ 3AR), has been shown to improve peripheral metabolic determinants. Since metabolic diseases are important risk factors for AD, and thermoregulatory deficits may worsen AD, we hypothesized that BAT stimulation could be beneficial in AD by correcting both thermoregulatory deficits and metabolic disorders.

The aim of this thesis was to determine whether the stimulation of BAT thermogenesis reduces neuropathology and behavioral deficits in a mouse model of AD, the 3xTg-AD mouse.

First, we showed that advanced age potentiates tau phosphorylation induced by acute cold exposure. Secondly, we observed that repeated short cold exposures increased the thermogenesis capacity of BAT and reduced glucose intolerance in aged 3xTg-AD mice. Better thermoregulation provided protection against tau phosphorylation induced by an acute cold exposure. In addition, we reported a negative correlation between fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels and tau phosphorylation in the hippocampus, suggesting that this BAT-secreted hormone is involved in neuroprotection against acute cold exposure. Finally, we investigated the effect of a  $\beta$ 3AR agonist on the neuropathology and memory of old 3xTg-AD mice. This pharmacological approach improved glucose tolerance and increased BAT thermogenesis in 16-month-old 3xTg-AD and NonTg mice. The treatment reversed the recognition memory deficiency and decreased the ratio of insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 peptides in the hippocampus of transgenic mice, without modulating tau phosphorylation.

These results show that interventions aiming at stimulating thermogenesis can reduce metabolic disorders and modulate neuropathology and behavioral deficits of AD in a mouse model. Thus, our results highlight thermoregulation as a novel therapeutic target for this disease.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvi
Introduction.....	1
1 La maladie d'Alzheimer.....	1
1.1 Définition, chiffres et symptômes.....	1
1.2 Diagnostic.....	2
1.2.1 Diagnostic clinique.....	2
1.2.2 Diagnostic neuropathologique.....	3
1.2.3 Biomarqueurs.....	3
1.3 Neuropathologie.....	4
1.3.1 Plaques amyloïdes.....	4
1.3.2 Enchevêtrements neurofibrillaires.....	7
1.3.3 Pertes synaptiques.....	10
1.3.4 Atrophie cérébrale.....	10
1.3.5 La neuroinflammation.....	11
1.3.6 Autres neuropathologies et neuropathologies mixtes.....	12
1.4 Facteurs de risque de la MA.....	13
1.4.1 Formes familiales de la maladie.....	13
1.4.2 Formes sporadiques de la maladie.....	14
1.4.2.1 Les facteurs de risque non modifiables.....	14
1.4.2.1.1 L'âge.....	14
1.4.2.1.2 La génétique.....	15
1.4.2.1.3 Le sexe.....	17
1.4.2.2 Les facteurs de risque modifiables.....	17
1.4.2.2.1 Hypertension et maladies cardiovasculaires.....	17
1.4.2.2.2 Maladies métaboliques.....	18
1.4.2.2.3 Alimentation.....	20
1.4.2.2.4 Autres facteurs de risque.....	21
1.5 Les traitements.....	21
1.5.1 La prévention.....	21
1.5.2 Les traitements actuels.....	22
1.5.2.1 Inhibiteurs de la cholinestérase.....	22
1.5.2.2 Antagoniste des récepteurs NMDA.....	23
1.5.3 Les traitements en essai clinique.....	23
1.6 Les modèles animaux de la MA.....	25
1.6.1 Les modèles de pathologie amyloïde.....	25
1.6.2 Les modèles de pathologie tau.....	26

1.6.3	La souris triple transgénique 3xTg-AD.....	26
1.6.4	Autres modèles animaux.....	28
<b>2</b>	<b>Les désordres métaboliques observés dans la maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>29</b>
2.1	Diminution du métabolisme cérébral du glucose.....	29
2.2	Résistance à l'insuline centrale .....	31
2.3	Repositionnement thérapeutique de médicaments antidiabétiques dans la MA.....	33
2.3.1	Insuline .....	33
2.3.2	Les thiazolidinediones .....	34
2.3.3	Analogues de GLP-1.....	35
<b>3</b>	<b>La thermorégulation.....</b>	<b>37</b>
3.1	Définition.....	37
3.2	Régulation centrale de la température corporelle .....	38
3.2.1	La détection par les thermorécepteurs.....	38
3.2.2	Intégration centrale du signal par l'hypothalamus .....	39
3.3	Régulation périphérique de la température corporelle .....	41
3.3.1	Thermolyse.....	41
3.3.2	Thermogenèse et tissu adipeux brun .....	42
3.4	Stimulation de la thermogenèse : cible thérapeutique pour les maladies métaboliques	
	45	
3.4.1	Les expositions au froid.....	45
3.4.2	Les agonistes des récepteurs $\beta$ 3 adrénergiques .....	46
3.4.3	Le tissu adipeux brun : un organe endocrinien .....	51
<b>4</b>	<b>Thermorégulation et maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>53</b>
4.1	Déficits de thermorégulation chez les personnes âgées .....	53
4.2	Déficits de thermorégulation dans la maladie d'Alzheimer .....	55
4.3	Thermorégulation et maladie d'Alzheimer : arguments issus d'études animales.....	56
	<b>Hypothèses et objectifs.....</b>	<b>59</b>
<b>1</b>	<b>Hypothèses .....</b>	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>Objectifs.....</b>	<b>60</b>
2.1	Objectif spécifique 1.....	60
2.2	Objectif spécifique 2.....	61
2.3	Objectif spécifique 3.....	61
	<b>Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer. ..</b>	<b>63</b>
1.1.	Résumé .....	65
1.2.	Abstract .....	65
1.3.	Introduction.....	65
1.4.	Methods .....	66
1.4.1.	Animals and cold exposure.....	66
1.4.2.	Protein extraction and Western immunoblotting .....	67
1.4.3.	Quantitative real-time PCR.....	67
1.4.4.	Statistical analysis.....	68
1.5.	Results .....	68
1.5.1.	Enhanced cold-induced phosphorylation of soluble tau in old mice compared to young mice.	
	68	
1.5.2.	GSK3 $\beta$ inactivation in young but not in old mice.....	69
1.6.	Discussion .....	69
1.7.	Acknowledgements .....	70

1.8. Figures .....	71
1.9. Supplementary data .....	72

## **Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent un modèle murin de la maladie d'Alzheimer de la phosphorylation de tau induite par le froid.**

.....	<b>73</b>
1.1. Résumé .....	75
1.2. Abstract .....	75
1.3. Introduction.....	76
1.4. Methods .....	78
1.4.1. Animals and diet.....	78
1.4.2. Cold exposures .....	78
1.4.3. Glucose tolerance test.....	79
1.4.4. Protein extraction.....	79
1.4.5. Western immunoblotting .....	79
1.4.6. A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 quantification .....	80
1.4.7. Quantitative real-time PCR.....	80
1.4.8. FGF21 assay .....	80
1.4.9. Triglycerides assay.....	80
1.4.10. Histology and UCP1 immunostaining .....	80
1.4.11. Corticosterone ELISA .....	81
1.4.12. Statistical analysis.....	81
1.5. Results .....	82
1.5.1. Repeated short cold exposures potentiate BAT thermogenic capacity and protect old 3xTg-AD mice against cold-induced decreases in body temperature .....	82
1.5.2. Repeated short cold exposures improve glucose tolerance in 16-month-old 3xTg-AD mice	83
1.5.3. Repeated short cold exposures protect old 3xTg-AD mice against cold-induced tau phosphorylation .....	83
1.5.4. Repeated short cold exposures lead to FGF21 accumulation in plasma .....	84
1.6. Discussion .....	84
1.6.1. Increased thermogenesis capacity following RSCE in old mice .....	85
1.6.2. RSCE improved peripheral metabolic disorders .....	86
1.6.3. RSCE protected against cold-induced tau phosphorylation .....	86
1.6.4. RSCE increased FGF21 production.....	88
1.6.5. Conclusions.....	88
1.7. Acknowledgements .....	89
1.7.1. Author contributions .....	89
1.7.2. Funding.....	89
1.8. Figures .....	90
1.9. Supplementary data .....	95

## **Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs $\beta$ 3 adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer..... 100**

1.1. Résumé .....	102
1.2. Abstract .....	102
1.3. Introduction.....	103
1.4. Methods .....	105
1.4.1. Animals.....	105
1.4.2. CL-316,243 treatment .....	105

1.4.3.	Body temperature measurement and analysis .....	106
1.4.4.	Glucose tolerance test.....	106
1.4.5.	Behavioral tests .....	106
1.4.6.	Tissue preparation for postmortem analysis.....	107
1.4.7.	Protein extractions .....	107
1.4.8.	Western immunoblotting .....	108
1.4.9.	A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides quantification .....	108
1.4.10.	Immunohistochemistry .....	108
1.4.11.	Statistical analysis.....	108
1.5.	Results .....	109
1.5.1.	$\beta$ 3AR stimulation improves peripheral glucose metabolism in old mice. ....	109
1.5.2.	$\beta$ 3AR stimulation increases brown adipose tissue thermogenesis. ....	110
1.5.3.	$\beta$ 3AR stimulation reverses memory deficits in 16-month-old 3xTg-AD mice.....	110
1.5.4.	$\beta$ 3AR stimulation reduces insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus of 3xTg-AD mice but has no effect on tau phosphorylation nor synaptic proteins.....	111
1.6.	Discussion .....	112
1.6.1.	$\beta$ 3AR agonist: a two in one strategy to target both metabolic and thermoregulatory defects 113	
1.6.2.	$\beta$ 3AR stimulation reverses memory deficits in old 3xTg-AD mice.....	114
1.6.3.	$\beta$ 3AR stimulation decreases insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus of 3xTg-AD mice 115	
1.6.4.	Conclusion: potential translation to clinic.....	115
1.7.	Acknowledgements .....	116
1.8.	Figures .....	117
1.9.	Supplementary data .....	122
<b>Conclusion .....</b>		<b>124</b>
<b>1</b>	<b>Retour sur les résultats.....</b>	<b>124</b>
	Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer. ....	124
	Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent un modèle murin de la maladie d'Alzheimer de la phosphorylation de tau induite par le froid. ....	125
	Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs $\beta$ 3 adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. ....	127
<b>2</b>	<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>130</b>
2.1	Température corporelle et phosphorylation de la protéine tau .....	130
2.2	La thermorégulation dans les études chez le rongeur .....	132
2.3	Les altérations métaboliques et la MA.....	136
2.4	Mécanismes potentiels par lesquels la thermorégulation peut affecter la MA .....	138
2.5	Études précliniques dans la MA.....	143
<b>3</b>	<b>Conclusion générale .....</b>	<b>145</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>146</b>
<b>Annexe A : Article publié non inclus dans la thèse.....</b>		<b>185</b>
<b>Annexe B : Autres articles publiés .....</b>		<b>209</b>

# Liste des figures

## Introduction

Figure 1. Processus de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). .....	5
Figure 2. Formation des enchevêtrements neurofibrillaires. ....	8
Figure 3. Illustration de l'atrophie cérébrale dans la MA au stade avancé. ....	11
Figure 4. Les différents facteurs de risques génétiques de la MA. ....	15
Figure 5. Représentation des différentes études cliniques pour le traitement de la MA en 2018. ....	24
Figure 6. Représentation schématique du développement des pathologies amyloïdes et tau dans la souris 3xTg-AD. ....	27
Figure 7. Diminution de la captation du glucose au niveau cérébral mesuré par FDG-TEP chez un sujet sain et un sujet atteint de la MA. ....	30
Figure 8. Signalisation de l'insuline. ....	32
Figure 9. Schéma de la voie de régulation centrale de la thermogenèse du tissu adipeux brun. ....	40
Figure 10. Morphologie des tissus adipeux blancs et bruns. ....	43
Figure 11. Cascade d'activation de la thermogenèse du tissu adipeux brun. ....	44
Figure 12. Représentation schématique du récepteur $\beta_3$ adrénergique. ....	47
Figure 13. Les différentes « batokines » sécrétées par le tissu adipeux brun et leurs organes cibles. ....	51
Figure 14. Effets d'expositions au froid et à thermoneutralité chez la souris 3xTg-AD. ....	58

## Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer.

Figure 1.1. Cold exposure increases phosphorylation of soluble tau more importantly in old mice, while inactivating GSK3 $\beta$ only in young mice. ....	71
---	----

## Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent un modèle murin de la maladie d'Alzheimer de la phosphorylation de tau induite par le froid.

Figure 2.1. Repeated short cold exposures protect old 3xTg-AD mice against cold-induced decrease in body temperature by increasing thermogenesis. ....	90
Figure 2.2. Repeated short cold exposures improved glucose tolerance in 16-month-old 3xTg-AD mice and decrease plasmatic triglycerides without affecting white adipose depots. ....	91
Figure 2.3. Repeated short cold exposures protect old 3xTg-AD mice against cold-induced phosphorylation of soluble tau. ....	92
Figure 2.4. Repeated short cold exposures modify the levels of kinases involved in tau phosphorylation. ....	93
Figure 2.5. Repeated short cold exposures increase FGF21 production by BAT. ....	94
Supplementary Figure 2.1. No difference between cold-exposed and non-exposed mice on change in plasmatic corticosterone levels. ....	96
Supplementary Figure 2.2. Change in body temperature before and after each short cold exposure (raw data of Fig.1B). ....	97
Supplementary Figure 2.3. Cortical levels of amyloid peptides were not affected by repeated short cold exposures. ....	98

## Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs $\beta_3$ adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.

Figure 3.1. $\beta_3$ AR stimulation improves peripheral glucose metabolism in NonTg and 3xTg-AD mice. ....	117
Figure 3.2. CL-316,243 treatment increases brown adipose tissue thermogenesis. ....	118
Figure 3.3. $\beta_3$ AR stimulation reverses memory deficits in 16-month-old 3xTg-AD. ....	119

Figure 3.4.  $\beta$ 3AR stimulation reduces insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus of 3xTg-AD mice.....120  
Figure 3.5.  $\beta$ 3AR stimulation has no effect on tau phosphorylation in the hippocampus of 3xTg-AD mice.....121

### **Conclusion**

Figure C1. Persistance de l'hyperphosphorylation de tau après une seule exposition au froid de 24 heures à 4°C chez des souris non-transgéniques de 12 mois.....131  
Figure C2. Effet de l'exposition d'un mois à 28°C sur la température corporelle des souris âgées.....134  
Figure C3. Effet de l'antagoniste des récepteurs  $\beta$ 3 adrénergiques SR 59230A sur l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun chez la 3xTg-AD exposée au froid. ....135  
Figure C4. Mécanismes par lesquels l'activité de thermogénèse du tissu adipeux brun peut moduler la MA. 139

# Liste des tableaux

## Introduction

Tableau 1. Gènes impliqués dans les formes familiales de la MA.....	14
Tableau 2. Différents agonistes des récepteurs $\beta$ 3 adrénergiques.....	48
Tableau 3. Effet de la stimulation de la thermogenèse sur les désordres métaboliques dans des modèles animaux et chez l'Homme.....	50

## Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer.

Supplementary Table 1.1. Antibodies used in the study.....	72
--	----

## Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent les souris 3xTg-AD âgées de la phosphorylation de tau induite par le froid.

Supplementary Table 2.1. Composition of the "Western" diet.....	95
Supplementary Table 2.2. Quantification of the optical density of proteins detected by Western Blot in gastrocnemius muscles homogenates.....	97
Supplementary Table 2.3. Synaptic proteins and other markers are not affected by repeated cold exposures.....	99
Supplementary Table 2.4. Antibodies used in the study.....	99

## Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs $\beta$ 3 adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.

Supplementary Table 3.1. Other AD markers not affected by CL-316,243 treatment.....	122
Supplementary Table 3.2. Antibodies used in this study.....	123

## Conclusion

Tableau C1. Effets des différentes approches pour moduler la thermorégulation sur la neuropathologie de la MA chez la souris.....	129
---	-----



## Liste des abréviations

<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F-Fluorodésoxyglucose
3xTg-AD	Souris triple transgénique
Aβ	β-amyloïde
AGL	Acide gras libre
Agrp	Agouti related peptide
AICD	<i>Amyloid precursor protein intracellular domain</i>
AKT	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APOE	Apolipoprotéine E
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
AVC	Accident vasculaire cérébral
BACE-1	<i>Beta-site amyloid precursor protein-cleaving 1</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
DT2	Diabète de type 2
ENF	Enchevêtrements neurofibrillaires
FGF21	Facteur de croissance des fibroblastes 21
GLP-1	<i>Gucagon-like peptide-1</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter type 1</i>
GSK3β	Glycogène synthase kinase 3β
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HPLC	<i>Chromatographie liquide à haute performance</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IMC	Indice de masse corporelle
INSR	Récepteur à l'insuline
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LHS	Lipase hormonosensible
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPT	<i>Microtubule associated protein tau</i>
MC4R	<i>Melanocortin 4 receptor</i>
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MoCa	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
NE	Norépinephrine
NonTg	Souris non-transgénique
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E2
PKA	Protéine kinase A
POMC	Pro-opiomélanocortine
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PPAR <sub>γ</sub>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PSEN	Préséniline
Rβ3A	Récepteurs β3 adrénergiques
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
SAMP8	<i>Senescence accelerated mice-prone 8</i>
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNC	Système nerveux central
TAB	Tissu adipeux brun

TDP-43	<i>Transactive response DNA binding protein 43</i>
TEP	Tomographie à émission de positrons
TG	Triglycérides
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myloid cells 2</i>
TRP	<i>Temperature-activated transient receptor potential</i>
TZD	Thiazolidinediones
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

*« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien. »*  
Socrate

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse.

De nombreuses personnes ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Les articles présentés dans cette thèse sont le résultat d'un travail d'équipe, et j'ai eu la chance de faire partie d'une équipe incroyable et unie.

Je remercie mon directeur, le Dr Frédéric Calon, de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir fait confiance dès le début. Je suis reconnaissante de la liberté que vous m'avez accordée tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes résultats lors de nombreux congrès internationaux, pour vos conseils et votre support. Peut-être que nous serons amenés à collaborer ensemble dans quelques années !

Milène, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir prise sous ton aile lors de mes débuts dans le laboratoire. Tu as joué un rôle crucial dans le succès de ces travaux de recherche. Tu es un modèle de persévérance et tu sais relever tous les défis dans la plus grande sérénité. J'espère avoir la chance de travailler de nouveau avec toi dans le futur. Cyntia, tu es un élément indispensable pour l'équipe Calon. Je te remercie pour ton écoute, tes conseils et ta bienveillance à mon égard. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Vincent, tu es le deuxième pilier de l'équipe. Je te remercie pour ton regard critique et toujours constructif. Tu as su calmer mon enthousiasme parfois débordant et me remettre dans le droit chemin. Philippe, je te remercie pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble, dans la chambre froide et lors des longues journées de PCIS, avec ou sans Sean Paul. Olivier et Olivier, je vous remercie pour votre humour et surtout les cafés et bons plans nourriture que nous avons partagés et qui m'ont certainement réconfortée dans les moments difficiles. L'alliance franco-qubécoise n'a jamais été si bien représentée que par vous deux ! Manon et Vicky, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Isabelle, tes conseils précieux m'ont grandement aidé tout au long de mon doctorat. Je te remercie également pour les bons moments hors du laboratoire et j'espère que nos chemins (scientifiques, ou pas), se croiseront de nouveau ! Je remercie également les anciens membres de l'équipe Calon que j'ai eu la chance de côtoyer : Aurélie, Arnaud, Éric, Ariane, Katherine, Sarah, Alexandre, Marie-Thérèse et Jessica. Je tiens aussi à remercier les étudiants qui ont travaillé avec moi durant leur stage : Ruben, Nika, Cyrielle et Tra My. J'ai eu la chance de tomber sur vous, vous avez tous énormément travaillé et avec beaucoup d'enthousiasme. Hortense et Essi, je me sens très chanceuse que la cotutelle vous ait mises sur mon chemin. Je suis infiniment reconnaissante du support scientifique et moral que vous m'avez apporté. Merci d'avoir partagé avec moi votre passion pour la science et l'enthousiasme des nouveaux résultats, même tard le soir !

Il est important de mentionner que les membres du personnel de l'animalerie du CHUL ont également contribué à la réalisation de cette thèse. Je tiens particulièrement à remercier Stéphanie Bernard, Sonia Francoeur et France Duclos qui font un travail remarquable et m'ont accompagnée, conseillée et aidée tout au long de mes protocoles animaux. J'ai beaucoup appris de vous et ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

J'ai eu la chance de bénéficier du support de ma famille malgré l'océan qui nous a séparé pendant toutes ces années. Mamie et maman, vous êtes deux modèles de force pour moi. Maman, le fait que tu sois fière de moi à chaque étape m'a aidé à aller toujours plus loin. Ta force, ta persévérance et ton optimisme m'ont aidée à repousser mes limites. Philippe, tu es toujours là pour ma mère et moi, et je ne te remercierai jamais assez pour cela. Terence, je te remercie d'avoir subi mes humeurs, mes déceptions, ma fatigue et surtout mon stress toutes ces années. Malgré cela, tu as su me soutenir et me pousser à aller toujours plus loin.

Finalement, je tiens sincèrement à remercier les donateurs du Fonds d'Enseignement et de Recherche de la Faculté de pharmacie ainsi que ceux de la Société Alzheimer du Canada, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions et, je l'espère, d'avancer les connaissances sur cette terrible maladie.

# Avant-propos

## Notes introductives et contribution

La première partie de cette thèse est une revue de la littérature permettant d'introduire mes travaux de doctorat. Les chapitres 1 à 3 de cette thèse sont présentés sous forme d'articles publiés ou en préparation pour publication. Les autres publications issues de mon doctorat non incluses dans cette thèse sont mentionnés dans les annexes.

## Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer.

Ce chapitre est constitué à partir de l'insertion de l'article suivant:

Tournissac M, Vandal M, Francois A, Planel E, & Calon F. Old age potentiates cold-induced tau phosphorylation: linking thermoregulatory deficit with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **50**, 25–29 (2017).

Cet article a été accepté pour publication en septembre 2016 dans le journal *Neurobiology of Aging*. J'ai effectué les expérimentations animales (prises de température, expositions au froid, sacrifice des animaux), la grande majorité des expériences post-mortem (Western Blot, qPCR, HPLC), les analyses statistiques et l'interprétation des données, la rédaction et la révision du manuscrit. Dre Milène Vandal a réalisé la conceptualisation de l'étude, contribué à l'interprétation des données et la rédaction du manuscrit. Dr Arnaud François a réalisé les expériences de qPCR. Dr Frédéric Calon a participé à la conceptualisation de l'étude ainsi qu'à la rédaction de l'article. Le Dr Emmanuel Planel a participé à l'amélioration et la révision du manuscrit.

## Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent un modèle murin de la maladie d'Alzheimer de la phosphorylation de tau induite par le froid.

Ce chapitre est constitué à partir de l'insertion de l'article suivant:

Tournissac M, Bourassa P, Martinez C. RD, Vu TM, Planel E, Hébert S, Calon F. Repeated short cold exposures protect a mouse model of Alzheimer's disease from cold-induced tau phosphorylation. *Mol. Metab.* (2019).

Cet article a été accepté pour publication en janvier 2019 dans le journal *Molecular Metabolism*. J'ai élaboré la conceptualisation de l'étude sous la supervision du Dr Frédéric Calon. J'ai effectué les expérimentations animales avec l'aide de Philippe Bourassa (tests métaboliques, expositions au froid, suivi de poids et de consommation des animaux, sacrifice des animaux). J'ai réalisé la moitié des expérimentations post-mortem, dont des Western Blot, la qPCR, les immunohistochimies, les dosages ELISAs. Philippe Bourassa et Ruben Martinez m'ont aidé pour les extractions protéiques, les Western Blot et les dosages des peptides amyloïdes. Philippe a réalisé les dosages de corticostérone et a révisé l'article. Tra My Vu a réalisé des Western Blot, m'a aidé pour les immunohistochimies et les expérimentations additionnelles lors des révisions de l'article. J'ai rédigé le manuscrit avec la supervision du Dr Frédéric Calon. J'ai réalisé les analyses statistiques et

l'interprétation des résultats. Les Dr Emmanuel Planel et Sébastien Hébert ont participé à l'amélioration du manuscrit.

### **Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs $\beta_3$ adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.**

Ce chapitre est constitué à partir de l'insertion de l'article suivant:

Tournissac M, Vrabic N, Vu TM, Hozer C, Tremblay C, Planel E, Pifferi F, Calon F. A beta3-adrenergic receptor agonist reverses memory deficits and reduces insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in a mouse model of Alzheimer's disease.

Cet article est en préparation pour soumission prochaine. J'ai élaboré la conceptualisation de l'étude sous la supervision du Dr Frédéric Calon. J'ai réalisé l'intégralité des expérimentations animales (tests métaboliques et comportementaux, administration des traitements, implantation des sondes de télémétrie, suivi de poids, de température et de consommation des animaux, sacrifice des animaux). Nika Vrabic m'a aidé à faire l'extraction protéique de l'hippocampe ainsi que la majorité des Western Blots. Tra My Vu a réalisé des Western Blot, les coupes de cerveau, l'immunohistochimie pour le marquage des plaques et m'a aidé pour quelques injections intrapéritonéales de la dernière partie des animaux. Clara Hozer a réalisé les analyses des données de température par télémétrie sous la supervision du Dr Fabien Pifferi. Cyntia Tremblay a fait le dosage des peptides amyloïdes. Le Dr Emmanuel Planel a participé à l'amélioration de l'article. Le Dr Frédéric Calon a participé à la rédaction de l'article et son amélioration. J'ai fait l'ensemble des analyses statistiques et l'interprétation des résultats. J'ai rédigé le manuscrit.

### **Annexe 1 : Articles complétés, non inclus dans la thèse**

Tournissac, M, Vandal, M, Tremblay, C, Bourassa, P, Vancassel, S, Emond, V, Gangloff, A, Calon, F. Dietary intake of branched-chain amino acids in a mouse model of Alzheimer's disease: Effects on survival, behavior, and neuropathology. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4, 677–687 (2018).

Cet article a été accepté pour publication dans le journal *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* en novembre 2018. Dre Milène Vandal a fait la conceptualisation de l'étude avec le Dr Frédéric Calon. J'ai réalisé la totalité des expérimentations animales (tests comportementaux, mise sur diète et sacrifice des animaux), la majorité des analyses post-mortem (Western Blot, dosages par HPLC, ELISAs), l'analyse des données. J'ai rédigé le manuscrit. Cyntia Tremblay a fait le dosage des peptides amyloïdes. Philippe Bourassa a réalisé quelques Western Blot et a révisé l'article. Dre Sylvie Vancassel a fait les dosages des catécholamines dans le cortex frontal (HPLC) et a révisé l'article. Dr Vincent Émond a contribué à l'amélioration du manuscrit et m'a aidé pour les dosages de catécholamines dans l'hippocampe (HPLC). Dre Anne Gangloff a fait les dosages biochimiques dans le plasma des animaux et m'a aidé pour l'interprétation des résultats et l'amélioration du manuscrit. Dr Frédéric Calon a participé à la rédaction et l'amélioration du manuscrit.

# Introduction

## 1 La maladie d'Alzheimer

### 1.1 Définition, chiffres et symptômes

Le premier médecin à décrire la maladie d'Alzheimer (MA) est le neurologue allemand Dr Aloïs Alzheimer en 1906 (Alzheimer et al., 1995). Il étudia le cas d'Auguste Deter et analysa son cerveau au microscope à l'aide de techniques d'imprégnation argentique. Ainsi, il fut également le premier à dessiner les deux principaux marqueurs neuropathologiques de la maladie, soit les enchevêtrements neurofibrillaires (ENF) et les plaques séniles, sur lesquels les scientifiques s'appuient encore aujourd'hui pour diagnostiquer la maladie.

La MA est une maladie neurodégénérative qui affecte principalement les fonctions cognitives. Bien que les symptômes diffèrent d'un sujet à l'autre, la MA est caractérisée par une perte très progressive de ces facultés (Lyketsos et al., 2011). La mémoire est la fonction principalement affectée dans la maladie, et plus particulièrement la mémoire épisodique dans les premiers stades. En effet, les sujets ont de la difficulté à se souvenir de ce qu'ils viennent de faire, tandis que les souvenirs plus lointains sont conservés. Par la suite, on observe une perte de la mémoire spatiale, qui se caractérise par une désorientation (Alzheimer's association, 2018; Weintraub et al., 2012). Puis, progressivement, le langage et les fonctions exécutives (comme la planification par exemple) sont touchés. Globalement, les symptômes de la MA sont regroupés sous le terme des 4A pour amnésie (perte de mémoire), aphasie (trouble du langage), apraxie (difficulté à exécuter des gestes volontaires) et agnosie (trouble de la reconnaissance). Des troubles de l'humeur et de la personnalité sont également très fréquents, de même que la dépression et des psychoses dans lesquels les sujets peuvent être particulièrement agités (Zahodne et al., 2015). Ces symptômes mènent à une perte d'autonomie des individus malades : il devient impossible pour eux de vivre seul. Finalement, il est estimé qu'un sénior sur trois décède avec la MA (Alzheimer's association, 2018).

La MA représente plus de 70% des cas de démence. Au Canada en 2016, il est estimé que plus de 700 000 Canadiens sont touchés par la démence (Société Alzheimer du Canada). Puisque la MA affecte principalement les personnes âgées, la prévalence de la démence augmente avec le vieillissement de la population : elle devrait passer de 47 millions de personnes dans le monde en 2015 à 131 millions en 2050 (Winblad et al., 2016).

En plus d'affecter un très grand nombre de séniors, le fardeau économique de la maladie est énorme. Les coûts associés à la MA sont estimés à 818 milliards de dollars à l'échelle mondiale (Wimo et al., 2016), et à 10,4 milliards de dollars au Canada seulement (Société Alzheimer du Canada). Ces chiffres sont en constante augmentation et comprennent notamment les frais directs de santé, les frais d'hébergement et de soins de longue durée. En outre, il est estimé que plus de 18,4 milliards d'heures de soins sont données par la famille ou des personnes non rémunérées aux États-Unis (Alzheimer's association, 2018).

## 1.2 Diagnostic

### 1.2.1 Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de la MA est seulement « probable » et non définitif (Jack et al., 2018; Moore et al., 2014; Petersen, 2018). En effet, le véritable diagnostic de la MA se fait après la mort des individus grâce aux marqueurs neuropathologiques caractéristiques de la maladie (décrits à la section 1.3). En clinique, le diagnostic est basé principalement sur l'historique familial de la MA, des questions sur le quotidien de la personne, ses antécédents médicaux et des tests cognitifs (Alzheimer's association, 2018; McKhann et al., 2011; J. C. Morris et al., 2014). L'entourage du patient sera également consulté pour relever d'éventuelles dysfonctions que le sujet n'aurait pas mentionnées. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut compléter le diagnostic afin d'observer une éventuelle atrophie cérébrale, ou d'exclure un accident vasculaire cérébral (Frisoni et al., 2017; 2013; 2010). Ces différentes analyses permettent de distinguer les sujets cognitivement sains ou atteints de trouble cognitif léger ou modéré de ceux atteints de démence de type Alzheimer (Knopman et al., 2018b).

Les tests cognitifs les plus utilisés sont le MMSE (*Mini-Mental State Examination*), le test de l'horloge, ou encore le MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*). Le test de l'horloge consiste à demander au patient de représenter l'heure sur un cadran. Il est le plus rapide et permet d'apprécier des troubles exécutifs et visuo-spaciaux, mais il ne permet pas de poser un diagnostic seul ; il doit être complété par un autre test (Shulman, 2000). Le MMSE est le test le plus utilisé en clinique. Il contient 30 questions et permet d'évaluer la mémoire, l'attention, l'orientation spatio-temporelle et le langage en seulement 10 minutes (Arevalo-Rodriguez et al., 2015). Il donne un score entre 0 et 30 ; un score en dessous de 24 signalant un trouble cognitif. Le MoCA comprend 30 items et est quant à lui plus sensible pour diagnostiquer les cas de démence légère et permet d'évaluer en plus les fonctions exécutives.



## 1.2.2 Diagnostic neuropathologique

Le diagnostic définitif de la MA est seulement donné lors de l'évaluation neuropathologique, c'est-à-dire après la mort du sujet, grâce à un marquage immunohistologique du cerveau (Montine et al., 2016; 2012). Différentes échelles de diagnostic neuropathologique ont été développées selon les deux principaux marqueurs de la maladie, que sont les plaques amyloïdes et les ENF (voir section 1.3) (Bennett et al., 2006).

L'échelle de Braak est l'une des plus utilisées. Elle permet de donner un score de I à VI, VI étant le niveau le plus élevé d'ENF causés par l'agrégation de la protéine tau (H. Braak and E. Braak, 1991). Cette échelle est basée sur l'observation des Dr Heiko et Eva Braak de la propagation spatio-temporelle des ENF à travers les différentes zones du cerveau, du cortex entorhinal vers l'hippocampe et l'amygdale pour finir sur les zones corticales dans les stades plus avancés de la MA (H. Braak et al., 2011). L'évolution de la pathologie selon les scores de Braak est corrélée avec le développement des symptômes de démence (Nelson et al., 2012; Tremblay et al., 2017).

Le CERAD pour *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* est quant à lui basé sur une évaluation semi-quantitative des plaques neuritiques, c'est-à-dire des plaques amyloïdes entourées de neurites dystrophiques (Mirra et al., 1991). Cette échelle permet de classer les sujets selon quatre stades : définitif, probable, possible ou pas de MA en fonction du nombre de plaques séniles comptées.

Finalement, le NIA-Reagan a été introduit par le *National Institute on Aging* et est une combinaison des scores de Braak et de CERAD. Il présente quatre niveaux de probabilité de MA : élevé, intermédiaire, faible et pas de MA ("Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease.," 1997; Jack et al., 2018; Knopman et al., 2018b; Montine et al., 2016).

## 1.2.3 Biomarqueurs

Une des plus grandes difficultés dans le domaine de la MA est l'impossibilité de poser un diagnostic précoce fiable. Ainsi, différents biomarqueurs pour le diagnostic de la MA sont à l'étude (Frisoni et al., 2017; Jack et al., 2018; Scheltens et al., 2016). Les mieux caractérisés et les plus utilisés dans les études cliniques sont les niveaux de peptides A $\beta$ 42 et de protéine tau, totale et phosphorylée, dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des sujets (Blennow and Zetterberg, 2018). Plus la quantité de peptides est basse dans le LCR, plus

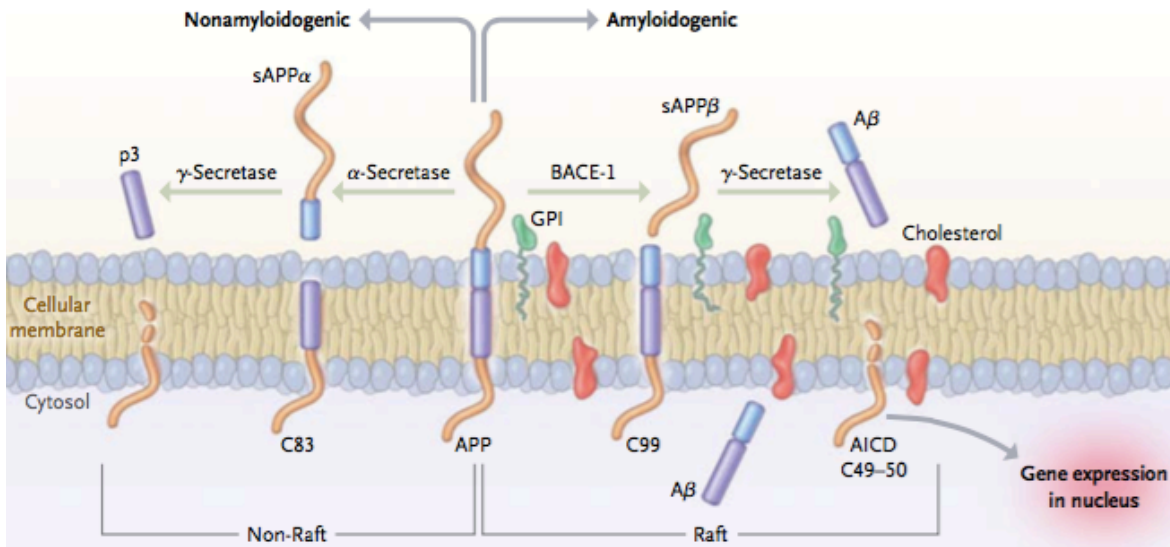
elle reflète un niveau élevé de celle-ci dans le parenchyme cérébral des individus (A. L. Young et al., 2014). La diminution de peptides  $\beta$ -amyloïdes ( $A\beta$ ) 42 dans le LCR serait le premier biomarqueur à apparaître dans les cas familiaux de MA. Selon une étude longitudinale, cette baisse est significative environ 25 ans avant l'âge attendu d'apparition des premiers symptômes (Bateman et al., 2012). Une récente étude sur plus de 1000 participants a montré que la quantité plasmatique de peptides  $A\beta$ 40 et  $A\beta$ 42 est également plus basse chez les sujets atteints de la MA et de trouble cognitif léger comparativement aux sujets sains (Hanon et al., 2018). De plus, les niveaux d' $A\beta$ 42 dans le plasma sont corrélés avec les scores cognitifs des individus, suggérant que le dosage plasmatique plutôt que dans le LCR, qui nécessite une ponction lombaire, pourrait être un biomarqueur valide pour la MA et surtout moins invasif.

## 1.3 Neuropathologie

Les deux principaux marqueurs neuropathologiques de la MA sont les plaques séniles (ou plaques amyloïdes) et les ENF. Ils sont connus depuis la description d'Alois Alzheimer en 1906 (Alzheimer et al., 1995). Ils constituent les éléments qui permettent de confirmer ou non le diagnostic clinique de la maladie et sont les seuls qui permettent de réellement discriminer un cas de MA d'un autre type de démence. Même si nous ne savons toujours pas si ces marqueurs sont réellement la cause ou la conséquence de la pathologie, ils apparaissent plusieurs années avant les premiers symptômes et sont encore aujourd'hui les principales cibles pour le développement de nouvelles thérapies.

### 1.3.1 Plaques amyloïdes

Un des marqueurs neuropathologiques principaux de la MA est la présence de plaques amyloïdes (Selkoe and Hardy, 2016). Les plaques amyloïdes sont formées par l'agrégation des peptides  $A\beta$  en plaque (Scheltens et al., 2016). Ces peptides sont libérés par le clivage de la protéine *amyloid precursor protein* (APP), une protéine transmembranaire jouant un rôle dans la neurogenèse et la fonction synaptique (Figure 1) (Kamenetz et al., 2003; Tyan et al., 2012).



**Figure 1. Processus de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP).**

Extrait de Querfurth et LaFerla, 2010 (Querfurth and LaFerla, 2010).

**Abbréviations :** A $\beta$  :  $\beta$ -amyloid peptide; AICD : amyloid intracellular domain; APP : amyloid precursor protein; BACE-1 :  $\beta$ -secretase beta-site amyloid precursor protein–cleaving enzyme 1; C83 : 83-residue carboxy-terminal fragment ; C99 : 99-residue carboxy-terminal fragment ; GPI : glycosphosphatidylinositol; sAPP $\alpha$  : amyloid precursor protein ectodomain.

Il existe deux voies de clivage de l'APP : la voie non amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Karran and De Strooper, 2016; U. C. Müller et al., 2017). La première est réalisée par l'action successive de l' $\alpha$ -sécrétase, libérant le peptide  $\alpha$ -APP, puis de la  $\gamma$ -sécrétase, clivant le peptide C-terminal (C83) transmembranaire pour libérer le fragment p3 et AICD (*amyloid precursor protein intracellular domain*). La voie amyloïdogénique conduit quant à elle à la libération des peptides A $\beta$  comme son nom l'indique. Cette deuxième voie est le résultat du clivage d'APP par la  $\beta$ -sécrétase BACE-1 (pour *beta-site amyloid precursor protein-cleaving 1*) qui libère à la fois le peptide soluble  $\beta$ -APP et le fragment C-terminal membranaire (C99) (Vassar et al., 1999). Ce dernier est à son tour clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour produire l'AICD et des peptides de 36 à 43 acides aminés, dont les peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 qui sont majoritaires (Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

Les peptides A $\beta$ 42 ont pour particularité d'être hydrophobes et possèdent la propriété de s'auto-agréger (Jarrett et al., 1993). Ils initient la création de plaques, dans lesquelles les peptides A $\beta$ 40 se retrouvent également (Iwatsubo et al., 1994). Il est estimé que les dépôts amyloïdes apparaissent 10 à 20 ans avant

l'apparition des symptômes de la MA (Bateman et al., 2012; Tanzi, 2012). Le ratio de production de peptides A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 est d'environ 10/90, mais ce ratio est augmenté dans la MA ainsi que dans les cas de MA familiaux, c'est-à-dire chez les porteurs d'une mutation génétique dans le gène APP ou la préséniline (PSEN), la site catalytique de la  $\gamma$ -sécrétase (voir section 1.4.1) (Tanzi, 2012). Dans le cas de la MA, il y aurait un déséquilibre de l'activité des enzymes qui conduirait à la surproduction des peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 (Selkoe and Hardy, 2016). Ainsi, plusieurs inhibiteurs de BACE-1 ont été développés comme traitement pour la maladie, sans succès pour le moment (Cummings et al., 2018; Vassar, 2014). Toutefois, l'hypothèse de la cascade amyloïde est remise en questions depuis plusieurs années car certains rôles protecteurs de ces peptides ont été identifiés et l'accumulation des peptides amyloïdes seule ne suffit pas à causer la MA (Carrillo-Mora et al., 2014; Skaper, 2012).

La majorité des études neuropathologiques ou animales se basent sur la quantité de plaques amyloïdes pour établir un niveau plus ou moins important de pathologie. Toutefois, une hypothèse selon laquelle les oligomères seraient plus toxiques que les plaques amyloïdes émerge depuis plusieurs années et est soutenue par une littérature scientifique abondante (Esparza et al., 2013; Klein et al., 2001; Viola and Klein, 2015). L'agrégation des peptides A $\beta$ 42 présente plusieurs étapes au cours desquelles ceux-ci forment des oligomères de 2 à 6 peptides, puis des fibrilles, pour finalement former des feuillets plissés  $\beta$  qui constituent les plaques amyloïdes (Kayed et al., 2009; Ono et al., 2009). Chez le rat, l'injection d'oligomères d'A $\beta$ 42 extraits de cerveaux de sujets décédés de la MA dans l'hippocampe perturbe la fonction synaptique et induit des troubles de la mémoire (Shankar et al., 2008). D'autres études ont montré que 6 injections d'oligomères (de monomères à tétramères) d'A $\beta$ 42 dans l'hippocampe suffisent à induire une perte neuronale et des déficits cognitifs chez le rat (Brouillette et al., 2012; Sajadi et al., 2016). En effet, ces oligomères perturberaient la communication synaptique en s'intercalant au sein des fentes synaptiques (Brouillette, 2014).

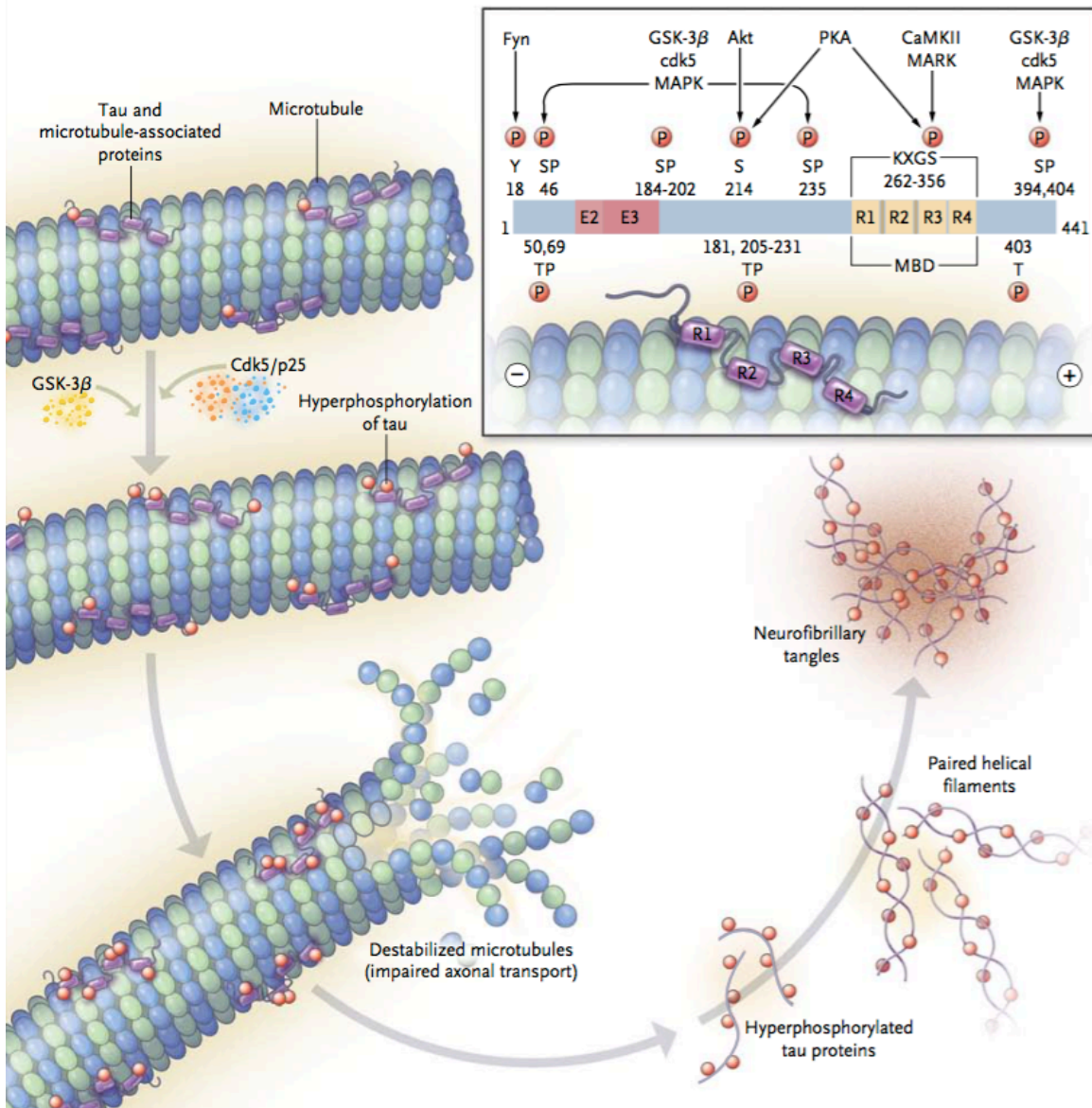
Un autre mécanisme conduisant à l'accumulation de peptides amyloïdes dans la MA serait la diminution de leur clairance du cerveau vers le sang. En effet, plusieurs études ont montré une diminution de l'expression du transporteur LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*), qui participe à la clairance des peptides du cerveau vers le sang, et à l'inverse une augmentation de RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans des cerveaux de sujets décédés de la MA (Deane et al., 2004; Donahue et al., 2006; Miller et al., 2008; Wilhelmus et al., 2007). Au niveau du LCR, les peptides A $\beta$  peuvent être transportés par la transthyrétine (ou préalbumine), une protéine impliquée principalement dans le transport du rétinol et de la thyroxine qui se trouve diminuée chez les patients atteints de la MA (Serot et al., 1997). Finalement, une baisse d'activité des enzymes impliquées dans la dégradation d'A $\beta$ , IDE (*insulin degrading enzyme*) et neprilysin, contribuerait également à la formation des plaques amyloïdes (Farris et al., 2003; Kanemitsu et al., 2003).

### 1.3.2 Enchevêtrements neurofibrillaires

La protéine tau est présente au niveau des microtubules des cellules neuronales. Elle est produite à partir de l'expression du gène *MAPT* pour *microtubule-associated protein tau* située sur le chromosome 17 (Buée et al., 2000). Six isoformes différentes sont trouvées chez l'humain, variant de 352 à 441 acides aminés, se distinguant entre elles principalement dans la présence de trois ou quatre domaines répétés dans la région C-terminale de la protéine (Goedert et al., 1989; Kitamura et al., 2005).

Le principal rôle de la protéine tau est de stabiliser les microtubules et de participer au transport axonal. La protéine tau peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la troncation, l'ubiquitination, la glycosylation, l'acétylation ou encore la phosphorylation (M. Morris et al., 2015). Toutefois, la phosphorylation résultant de l'action de différentes kinases et phosphatases est la modification principale que subit la protéine tau : plus de 80 sites de phosphorylations sur la protéine sont connus (Martin et al., 2011). Cette phosphorylation physiologique va modifier son degré d'attachement aux microtubules et ainsi contribuer à la plasticité neuronale. Toutefois, dans le cas de la MA et d'autres tauopathies, la protéine tau est hyperphosphorylée, ce qui va conduire à son détachement des microtubules et son relargage au niveau cytosolique (Figure 2) (Iqbal et al., 2016). L'hyperphosphorylation de ces protéines tau « libres » va causer leur modification de conformation tridimensionnelle et induire leur agrégation (Bretteville and Planel, 2008). Les protéines tau hyperphosphorylées vont s'agréger en oligomères puis former des ENF à l'intérieur des neurones (Ren and Sahara, 2013).

Les principales kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau sont GSK3 $\beta$ , AKT, MAPK, cdk5 et CaMKII. La kinase GSK3 $\beta$  en particulier est responsable de la phosphorylation de plus de 30 sites sur la protéine tau, ce qui fait d'elle une kinase majeure pour la pathologie tau (Hooper 2008). Ainsi, différents inhibiteurs pour cette kinase ont été testés dans des modèles murins de la MA, mais les effets indésirables conséquents à l'inhibition de cette enzyme, impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, ont compromis le développement de ces thérapies dans la MA (Hooper et al., 2008; Kremer et al., 2011). AKT peut également phosphoryler tau au niveau de la serine 214, mais son implication dans l'hyperphosphorylation de tau réside principalement dans le fait qu'elle module l'activité de GSK3 $\beta$  (Gratuze et al., 2018; Griffin et al., 2005). En effet, AKT phosphoryle GSK3 $\beta$  au niveau de la serine 9, ce qui résulte en l'inactivation de GSK3 $\beta$ . Ainsi, une plus grande activité d'AKT est associée à une diminution de la phosphorylation de la protéine tau via l'inactivation de GSK3 $\beta$ . Les phosphatases sont également impliquées dans la régulation de la phosphorylation de tau. La PP2A est la principale phosphatase impliquée dans la régulation de tau; elle est également capable de moduler l'activité de GSK3 $\beta$  (Torrent and Ferrer, 2012).



**Figure 2. Formation des enchevêtrements neurofibrillaires.**

La protéine tau est associée aux microtubules par ses quatre domaines de répétition (R1 à R4). Son hyperphosphorylation par l'activité de différentes kinases et phosphatases provoque son détachement des microtubules, entraînant leur déstabilisation. Les protéines tau hyperphosphorylées vont s'agréger entre elles pour former des filaments puis des ENF. Plus de 80 sites de phosphorylations ont été identifiés sur la protéine tau. Les principales kinases impliquées dans cette hyperphosphorylation pathologique sont GSK3β, AKT, MAPK, cdk5 et CaMKII.

Extrait de Querfurth et LaFerla, 2010 (Querfurth and LaFerla, 2010).

**Abréviations** : AKT : protéine kinase B; CaMKII : calcium-calmodulin protein kinase 2; cdk5 : cyclin-dependent kinase; GSK3 $\beta$  : glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; MAPK : mitogen-activated protein kinase; MARK : microtubule affinity-regulating kinase; MBD : microtubule-binding domain; P : proline; p25 : cdk5 activator subunit; PKA : protein kinase A; S: serine; T : threonine.

Il est important de noter que parmi tous les sites de phosphorylation présents sur la protéine tau, la plupart sont considérés comme physiologiques, alors que d'autres sont considérés comme anormaux. L'hyperphosphorylation de la protéine tau sur ses sites physiologiques et la phosphorylation des sites anormaux sont impliqués dans l'agrégation de la protéine tau (M. Morris et al., 2011). Il est estimé que la protéine tau possède environ 3 groupements phosphates en condition physiologique, tandis que ce nombre augmente jusqu'à huit fois en condition pathologique (Khatoon et al., 1994). De nombreuses études neuropathologiques et *in vitro* ont permis de mettre en évidence les principaux sites de phosphorylation impliqués dans l'agrégation de la protéine tau et la MA : Ser202, Thr205, Ser396, Ser422, Ser404, Ser262, Thr212, Thr231, Thr181 (Alonso et al., 2010; Augustinack et al., 2002; Daly et al., 2000; Haase et al., 2004; Martin et al., 2011).

L'hyperphosphorylation de la protéine tau, ainsi que la quantité de protéine tau insoluble (agrégée) et d'ENF sont fortement corrélées au diagnostic clinique des sujets décédés de la MA, appuyant son rôle dans le développement de la maladie (Bennett et al., 2004; Tremblay et al., 2017; 2007). Des stratégies thérapeutiques visant à diminuer la quantité de tau hyperphosphorylée ou sa capacité à s'agréger ont été testées chez l'animal et l'humain, mais aucun de ces traitements n'a pour le moment été approuvé pour une utilisation clinique (Asuni et al., 2007; Cummings et al., 2018; Kontsekova et al., 2014). Toutefois, nous ne savons toujours pas avec certitude si la pathologie tau est une cause ou une conséquence de la MA. Il faut noter que la présence d'ENF est fréquente dans le cerveau de personnes âgées cognitivement saines (Bennett et al., 2006), et que ces agrégats sont retrouvés dans d'autres maladies neurodégénératives, regroupées sous le terme de tauopathies, telle que la démence fronto-temporale, le syndrome de Down ou encore la maladie de Pick (Buée et al., 2000; Sergeant et al., 2005). Les ENF ont récemment été retrouvés dans la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative purement génétique (St-Amour et al., 2017). Ces études indiquent que les ENF ne sont pas spécifiques à la MA, et suggèrent que le phénomène d'agrégation de la protéine tau pourrait être une conséquence de la maladie plutôt qu'une cause.

### 1.3.3 Pertes synaptiques

La synapse correspond à la zone où deux neurones entrent en contact. Les pertes synaptiques sont connues depuis longtemps dans la MA (Terry et al., 1991). En effet, la diminution de la quantité de protéines synaptiques est très claire dans le cerveau des sujet décédés de la MA, et apparaît dès les stades précoces de la maladie (Counts et al., 2014). Les déficits synaptiques quantifiés au niveau post-mortem corrént de façon robuste avec les déficits cognitifs des individus. Une étude a montré que les protéines pré-synaptiques synaptophysine et syntaxine 3 étaient diminuées dans le cortex pariétal dès le stade de trouble cognitif léger, et que les protéines pré-synaptiques synaptophysine et septin-3 corrélaient de façon positive avec le score cognitif global de l'ensemble des sujets déments et sains (Tremblay et al., 2017). Une autre étude a montré que la quantité de SNAP-25 (*Synaptosomal-associated protein 25*) dans le cortex préfrontal était corrélée au taux de déclin cognitif calculé sur les huit années avant la mort du sujet (Bereczki et al., 2016). Également, la protéine drébrine est diminuée d'environ 25% dans le cortex des sujets atteints de la MA et son expression corréle avec la pathologie tau ainsi que la durée des symptômes de la MA avant la mort des individus (Julien et al., 2008). Finalement, quelques études cliniques ont observé des niveaux augmentés de protéines pré-synaptiques (SNAP25) et post-synaptiques (neurogranine) dans le LCR dès les stades précoces de la MA, suggérant que ces protéines pourraient être des biomarqueurs pour la MA (Brinkmalm et al., 2014; Kvartsberg et al., 2015). Toutefois, ces deux protéines ne sont pas spécifiques à la MA puisqu'elles sont également augmentées dans le LCR des sujets atteints de Parkinson (Bereczki et al., 2017).

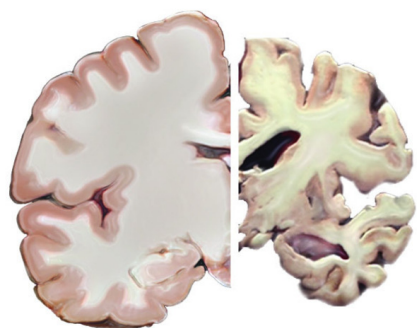
### 1.3.4 Atrophie cérébrale

La MA étant une maladie neurodégénérative, l'atrophie cérébrale causée par les pertes synaptiques puis une mort neuronale apparaît dans les stades précoces de la MA et fait partie intégrante du diagnostic comme discuté plus haut. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de détecter ces changements morphologiques (Frisoni et al., 2010). Il est possible de mesurer l'atrophie du cerveau entier, mais le cortex entorhinal est la première région touchée, suivie de l'hippocampe et l'élargissement des ventricules puis le cortex temporal, suivant ainsi l'évolution spatio-temporelle de la pathologie tau dans le cerveau (Thompson et al., 2003).

Avec le vieillissement normal, une atrophie des régions corticales d'environ 10% est observée (Erten-Lyons et al., 2013; Fotenos et al., 2005; Freeman et al., 2008). En revanche, dès le stade de trouble cognitif léger, la perte neuronale dans le cortex entorhinal est de près de 30% et corréle avec les troubles cognitifs des sujets (M. C. Evans et al., 2010; Kordower et al., 2001). Plus frappant encore, une étude d'IRM à haute résolution sur



près de 400 sujets a montré que le taux d'atrophie cérébrale globale est de 0,45% par année chez un individu sain, tandis qu'il double pour atteindre 0,98% pour les individus atteints de démence légère de type Alzheimer (Pakkenberg et al., 2003). Une autre étude sur des données d'IRM de plus de 700 participants issues de l'étude *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative* a mesuré une accélération de 0,22% du taux d'atrophie dans l'hippocampe chez les sujets atteints de trouble cognitif léger comparativement aux individus sains (Leung et al., 2013). Ainsi, l'atrophie cérébrale est attentivement examinée dans les études cliniques afin d'évaluer un potentiel effet « *disease modifying* » de l'intervention chez les participants (Frisoni et al., 2010).



**Cerveau sain | Maladie d'Alzheimer**

**Figure 3. Illustration de l'atrophie cérébrale dans la MA au stade avancé.**

Crédit illustration: National Institute on Aging.

### 1.3.5 La neuroinflammation

L'hypothèse que la MA serait une maladie inflammatoire s'est solidifiée ces dernières années (Heneka et al., 2015a; Heppner et al., 2015). En effet, des études *in vitro*, animales, épidémiologiques et neuropathologiques ont mis en évidence des processus inflammatoires interagissant avec les deux marqueurs neuropathologiques principaux de la MA : les pathologies amyloïdes et tau. Également, de nouveaux facteurs de risques génétiques tels que *Triggering receptor expressed on myloid cells 2* (TREM2) (discuté dans la section « 1.4.2.1.2 La génétique ») ont révélé l'implication des cellules immunitaires dans la MA. Ainsi, la neuroinflammation est aujourd'hui l'une des cibles thérapeutiques potentielles pour la MA.

Plusieurs mécanismes inflammatoires « anormaux » ont été identifiés dans la MA, mais seuls les principaux seront présentés ici. Les microglies sont des macrophages résidents du système nerveux central (SNC) et constituent la première ligne de défense immunitaire de ce dernier (Ransohoff and Engelhardt, 2012). Ces cellules sont notamment activées par les peptides A $\beta$  *in vitro* et dans des modèles murins de la MA (Bisht et al., 2016; Maezawa et al., 2011; Pan et al., 2011), et seraient impliquées dans la clairance des formes solubles et des fibrilles d'A $\beta$  (pour revue : (C. Y. D. Lee and Landreth, 2010)). Une étude qualitative (immunohistochimie) sur 19 sujets montre que les microglies se retrouvent également près des ENF, mais dans un état dystrophique et dans les premiers stades de Braak, suggérant que leur dégénérescence précoce est impliquée dans le développement de la MA (Streit et al., 2009). En revanche, il a récemment été montré que les microglies pouvaient adopter un phénotype trop « actif » en présence de pathologie amyloïde et phagocyter les synapses dans des modèles murins de la MA (Hong et al., 2016). Ces résultats suggèrent plutôt que l'activation microgiale consécutive de la neuropathologie Alzheimer deviendrait néfaste et contribuerait à la perte synaptique caractéristique de la MA (Rajendran and Paolicelli, 2018). De manière assez similaire, les astrocytes constituent un autre type de cellule immunitaire résidente du SNC ayant une capacité de clairance des plaques amyloïdes (Pihlaja et al., 2011; Wyss-Coray et al., 2003), parmi d'autres rôles variés tels que la transmission synaptique, le métabolisme énergétique ou encore le maintien de l'unité neurovasculaire (Sofroniew and Vinters, 2010). Une astrogliose est observée près des plaques amyloïdes dans des modèles animaux de MA (Olabarria et al., 2010) mais aussi dans le cerveau de sujets décédés de la MA (Serrano-Pozo et al., 2011; Webster et al., 2006). Finalement, l'infiltration de macrophages de la périphérie vers le parenchyme cérébral est observée de façon plus fréquente dans le cerveau d'individus décédés de la MA comparativement aux individus sains (Togo et al., 2002). Ces études ont conduit à tester différentes approches thérapeutiques pour la MA telles que les anti-inflammatoires et l'immunisation passive et active (voir section 1.5.2) (Butchart and Holmes, 2012; St-Amour et al., 2016).

### 1.3.6 Autres neuropathologies et neuropathologies mixtes

Près de la moitié des cas de diagnostic clinique probable de MA présente en fait réellement une neuropathologie mixte et non purement de type Alzheimer (Schneider et al., 2009; Schneider and Bennett, 2010; Sweeney et al., 2019).

La concomitance de pathologie vasculaire et de neuropathologie de type Alzheimer est la plus courante et s'élève à plus de 70% des cas de MA diagnostiqués cliniquement, bien que ces chiffres varient d'une étude à l'autre en fonction des lésions vasculaires étudiées (Kapasi et al., 2017; Toledo et al., 2013). Les pathologies vasculaires sont diverses, mais les principales observées dans la MA sont les macro et microinfarctus, les

athéroscléroses et les angiopathies amyloïdes (Iadecola, 2017). Les angiopathies amyloïdes cérébrales sont caractérisées par le dépôt de peptides amyloïdes dans les vaisseaux sanguins cérébraux (Kalaria and Kalimo, 2002). Ces dépôts sont observés dans le cerveau 20 à 40% des personnes âgées et dans près de 90% des cerveaux de personnes décédées de la MA (Attems et al., 2011).

D'autre part, les lésions de la matière blanche sont très répandues chez les sujets atteints de la MA et sont corrélées avec l'apparition de troubles cognitifs et de démence (Black et al., 2009). Ces lésions se présentent de manière diffuse près des ventricules cérébraux et sont visibles en IRM : elles sont caractérisées par des tâches diffuses plus blanches par rapport au tissu avoisinant et sont appelées « hyper-intensités » (Maillard et al., 2012).

D'autres protéinopathies sont fréquemment observées dans le cerveau de sujets décédés de la MA. L'accumulation de la protéine nucléaire TDP-43 (*Transactive response DNA binding protein 43*) dans le cytosol est caractéristique de la sclérose latérale amyotrophique (Sreedharan et al., 2008). Plusieurs études neuropathologiques ont montré la présence de cette protéinopathie dans des cerveaux de sujets diagnostiqués avec la MA ou un trouble cognitif léger (Ohta et al., 2014; Robinson et al., 2011; Tremblay et al., 2011). Finalement, les corps de Lewy formés par la protéine  $\alpha$ -synucléine, classiquement retrouvés dans la maladie de Parkinson, sont également retrouvés dans certains cas de MA (Mikolaenko et al., 2005).

## 1.4 Facteurs de risque de la MA

Il existe deux formes de la MA : la forme familiale, aussi appelée « *early-onset AD* », qui représente moins de 1% des cas, et la forme sporadique, ou « *late-onset AD* », la forme majoritaire (Tanzi, 2012).

### 1.4.1 Formes familiales de la maladie

Les formes familiales de la MA se caractérisent par une transmission génétique de mutations rares à pénétration complète et une apparition des symptômes de la maladie de façon précoce, c'est-à-dire généralement avant l'âge de 65 ans (Tanzi, 2012). Trois principaux gènes sont touchés par des mutations responsables de la forme héréditaire de la MA : *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* (Tableau 1). Ces mutations

conduisent à l'augmentation de la production des peptides A $\beta$ 42 et leur propension à s'agréger, ainsi qu'à l'augmentation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Bateman et al., 2012).

Gène	Protéine	Chromosome	Mutations rapportées	Phénotype moléculaire
<i>APP</i>	Protéine précurseur de $\beta$ amyloïde	21q21	24 (duplications)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ ratio A<math>\beta</math>42/A<math>\beta</math>40</li> <li>↑ production d'A<math>\beta</math></li> <li>↑ agrégation d'A<math>\beta</math></li> </ul>
<i>PSEN1</i>	Préséniline 1	14q24	185	↑ ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40
<i>PSEN2</i>	Préséniline 2	1q31	14	↑ ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40

**Tableau 1. Gènes impliqués dans les formes familiales de la MA.**

Traduit de (Tanzi, 2012).

Les causes de la MA dans ces cas précis sont donc génétiques et connues. Une grande partie des modèles cellulaires et animaux de MA reposent donc sur ces mutations afin de reproduire la pathologie amyloïde. En revanche, pour ce qui est de la pathologie tau, aucune mutation causale n'a à ce jour été retrouvée dans la MA. Les mutations P301S et P301L dans le gène *MAPT* sont observées dans la démence fronto-temporale (Goedert, 2018).

## 1.4.2 Formes sporadiques de la maladie

### 1.4.2.1 Les facteurs de risque non modifiables

#### 1.4.2.1.1 L'âge

L'âge avancé est indéniablement le plus important facteur de risque pour la MA (Rocca et al., 2011b; Solomon et al., 2014; Ziegler-Graham et al., 2008). En effet, la prévalence de la MA aux États-Unis passe de 3% entre 65 et 74 ans, à 17% de 75 à 84 ans et à 32% après 85 ans (Alzheimer's association, 2018; Hebert et al., 2013). Il est frappant de constater que même pour les formes héréditaires de la maladie, ayant une cause génétique, il faut attendre entre 30 et 60 ans avant que la pathologie se développe et que les premiers symptômes apparaissent (Tanzi, 2012). Finalement, une personne sur dix âgée de plus de 65 ans est atteinte de la MA (Hebert et al., 2010).

### 1.4.2.1.2 La génétique

Bien que seules les formes familiales de la maladie aient une cause génétique, le développement de la MA sous sa forme sporadique est grandement influencé par des susceptibilités génétiques avec lesquelles l'environnement interagit pour augmenter ou diminuer le risque de développer la MA. En effet, plusieurs facteurs de risques génétiques pour le développement la MA ont été identifiés, notamment grâce aux études d'association pangénomique ou GWAS pour *genome wide association studies* (Figure 4). Seuls deux gènes liés à une augmentation du risque de MA, les plus étudiés à ce jour, seront présentés ici : Apolipoprotéine E (*APOE*) et *TREM2*.

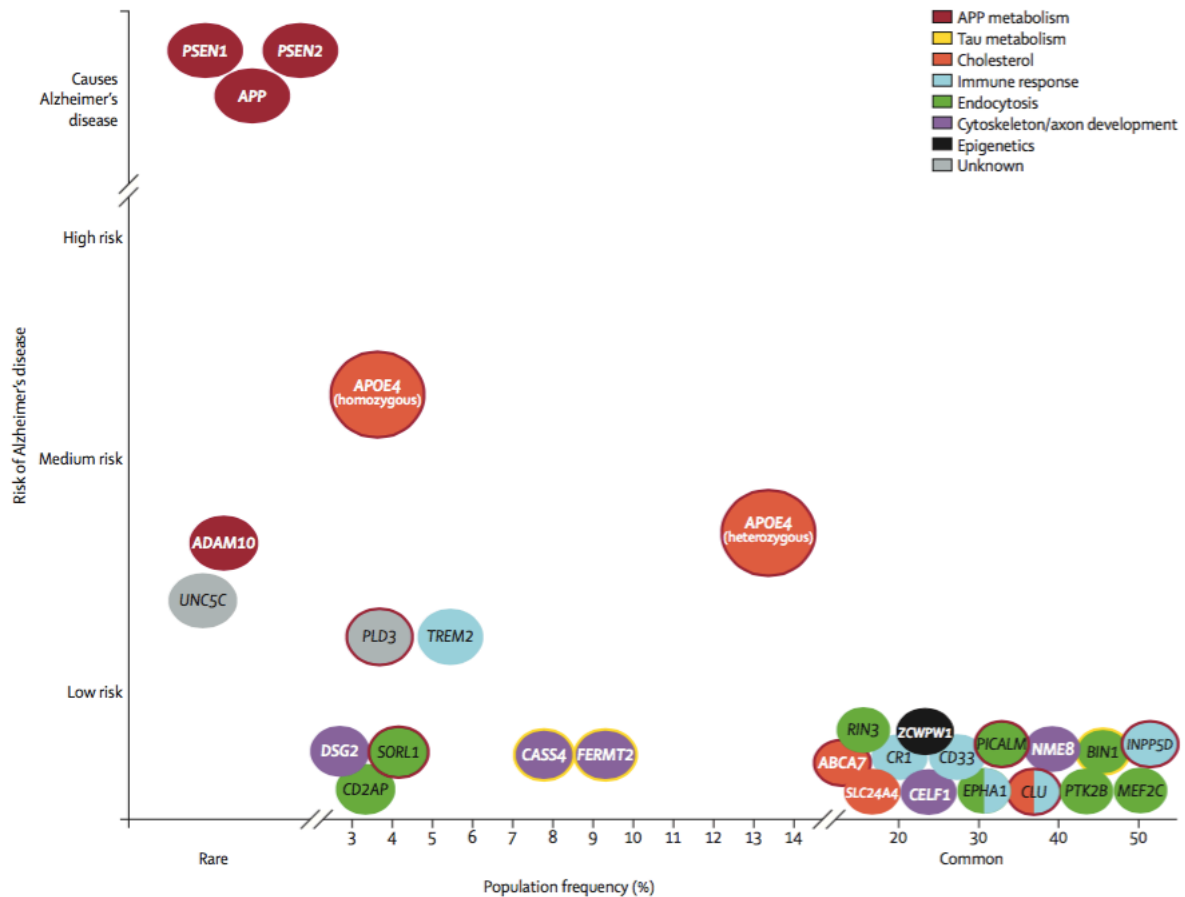


Figure 4. Les différents facteurs de risques génétiques de la MA.

Les différents facteurs de risques génétiques identifiés pour la MA sont présentés en fonction de leur fréquence dans la population (en %, rare ou commun) et du niveau de risque pour le développement de la MA (faible, moyen, élevé ou cause la MA). Extrait de (Scheltens et al., 2016).

Le principal facteur de risque génétique de la forme sporadique de la MA est l'allèle  $\epsilon 4$  du gène de l'apolipoprotéine E (APOE) (Michaelson, 2014). Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines responsables du transport des lipides dans le corps. Plus spécifiquement, l'apolipoprotéine de type E est responsable du transport du cholestérol et est principalement produite par le foie (Mahley et al., 2009; Phillips, 2014). Elle est présente sous trois isoformes : APOE2, E3 et E4. Ces isoformes diffèrent seulement par deux acides aminés (112 et 158) (Holtzman et al., 2012). Corder et collaborateurs furent les premiers en 1993 à identifier ce risque génétique dans la MA (Corder et al., 1993). En étudiant 42 familles avec des cas de MA sporadiques, ils ont montré que les porteurs homozygotes de l'allèle  $\epsilon 4$  avaient 12 fois plus de risque de développer la MA, tandis que les porteurs hétérozygotes avaient trois fois plus de risque. Cette augmentation du risque s'accompagne d'une apparition plus précoce des symptômes d'environ 15 ans par rapport à la moyenne. Au contraire, les porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  sont peu fréquents dans la population touchée par la MA et ont moins de risque de développer une démence (Berlau et al., 2009).

Les mécanismes liant APOE4 et la MA sont divers. L'APOE est impliquée dans le processus de production et de dégradation de l'A $\beta$  (Holtzman et al., 2012; Jiang et al., 2008). Toutefois, l'expression de l'isoforme E4 dans des modèles animaux de la MA augmente la production d'A $\beta$ 42 et perturbe sa clairance en interagissant avec le transporteur LRP1 (J. M. Castellano et al., 2011; Deane et al., 2008; Fryer et al., 2005; Liraz et al., 2013). Par ailleurs, le génotype APOE4 affecte la vasculature cérébrale et les transporteurs de la BHE dans des modèles animaux (Alata et al., 2015; Bell et al., 2012; Vandal et al., 2014a) ainsi que chez l'humain (Halliday et al., 2016). Bien que le rôle d'APOE4 sur la pathologie tau soit moins connu, une récente étude animale a montré que le génotype APOE4 interagit avec la protéine tau mutée (P301S), indépendamment de la pathologie amyloïde, pour aggraver la neurodégénérescence et la neuroinflammation (Y. Shi et al., 2017).

Un autre facteur de risque génétique important plus récemment identifié est *TREM2* pour *triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (Rohn, 2013). Ce récepteur est exprimé sur les microglies et leur permet de phagocyter des débris cellulaires (Neumann and Takahashi, 2007). Plusieurs variants dans le gène *TREM2* ont été associés à un plus grand risque de développer la MA (Guerreiro et al., 2013). L'hypothèse actuelle est que des variants du gène *TREM2* induisent la perte de fonction du récepteur et conduisent à l'incapacité des microglies à phagocyter les peptides amyloïdes (pour revue : (Ulland and Colonna, 2018)).

#### 1.4.2.1.3 Le sexe

Il est bien connu que le nombre de femmes affectées par la MA est plus grand que celui des hommes. Il est estimé qu'environ 65% des cas de MA sont des femmes (Mielke et al., 2014). Plusieurs raisons expliquent ces disparités. Tout d'abord, les femmes ont une espérance de vie plus élevée que les hommes (Tom et al., 2015). Le principal facteur de risque de la MA étant l'âge avancé, il n'est donc pas étonnant que plus de femmes soient touchées par la maladie. Une autre explication est que lors de la ménopause, les femmes subissent une chute drastique d'estrogènes, qui sont neuroprotecteurs, tandis que la diminution des hormones sexuelles est très progressive chez les hommes (Arevalo et al., 2015; Rocca et al., 2011a). Toutefois, ces différences sont remises en question par de récentes études prospectives : elles seraient probablement biaisées par le fait que les hommes ont une plus grande mortalité due aux maladies cardiovasculaires en milieu de vie (Chêne et al., 2015; Ruitenberg et al., 2001). Ainsi, les hommes plus âgés auraient un profil de risque cardiovasculaire plus faible que les femmes du même âge et donc un moins grand risque de développer la MA. En effet, l'incidence cumulative de MA est quant à elle similaire entre les hommes et les femmes dans l'étude prospective de la *Framingham Heart Study* (Chêne et al., 2015).

#### 1.4.2.2 Les facteurs de risque modifiables

De nombreux facteurs de risque environnementaux ont été associés à la MA, et les principaux seront présentés dans cette section. Ces facteurs sont considérés comme modifiables, c'est-à-dire qu'il est possible d'intervenir dessus afin de réduire la probabilité de développer la MA (Winblad et al., 2016). L'alimentation peut d'ailleurs influencer la majorité de ces facteurs de risque. Ainsi, du point de vue thérapeutique mais aussi préventif, il est crucial de bien comprendre leur importance dans la pathogenèse de la MA (Biessels, 2014).

##### 1.4.2.2.1 Hypertension et maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires désignent l'ensemble des maladies du cœur, des maladies vasculaires cérébrales et des maladies des vaisseaux sanguins (World Health Organization et al., 2011). Elles sont la principale cause de décès dans le monde (Benjamin et al., 2017). Plusieurs d'entre elles augmentent les risques de démence. D'une part, la fibrillation auriculaire ou arythmie cardiaque, une des maladies cardiovasculaires les plus communes, est associée avec une plus grande incidence de démence (Kwok et al.,

2011). D'autre part, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) conduisent souvent à des déficits cognitifs (Marshall, 2012). En effet, il est estimé que les personnes ayant subi un AVC ont deux fois plus de risque de développer une démence, et que 30% de cette population va développer des troubles cognitifs dans les trois années suivant l'accident (Allan et al., 2011).

L'hypertension est également l'un des plus grand facteur de risque de la MA, mais également la comorbidité la plus répandue chez les sujets atteints de MA (Reitz et al., 2010; J.-H. Wang et al., 2018). Une tension artérielle élevée en milieu de vie est associée au développement de trouble cognitif léger et de la MA à un âge plus avancé (Elias and Davey, 2012; Reitz et al., 2007; Shah et al., 2012). L'hypertension chronique induit des lésions cérébrovasculaires telles que des microinfarctus ou des microhémorragies cérébrales (Kalaria, 2012). Plusieurs études ont montré qu'une pression artérielle élevée augmente les marqueurs neuropathologiques de la MA et induit une apparition plus précoce des déficits cognitifs dans des modèles murins de la MA (Cifuentes et al., 2017; 2015; Díaz-Ruiz et al., 2009; Shih et al., 2018). Chez l'homme adulte, l'hypertension accroît l'atrophie cérébrale et les lésions de la matière blanche (Firbank et al., 2007).

De façon intéressante, des études épidémiologiques montrent que les traitements pour les maladies cardiovasculaires et l'hypertension sont associés à un risque plus faible de démence vasculaire et de MA (Mogi and Horiuchi, 2009; Zhuang et al., 2016; Zissimopoulos et al., 2017). En effet, les statines et les antihypertenseurs ont montré des effets bénéfiques pour renverser les déficits cérébrovasculaires, cognitifs et la pathologie amyloïde dans des modèles animaux de la MA (Hamel et al., 2016; Royea et al., 2017; Tong et al., 2009; J. Wang et al., 2007). Néanmoins, des études cliniques chez l'humain sont nécessaires afin d'apporter des preuves solides du bénéfice de ces traitements pour la MA.

#### *1.4.2.2.2 Maladies métaboliques*

Les maladies métaboliques les plus fréquentes apparaissent lorsque l'équilibre entre l'apport et la dépense énergétique est altérée. Elles regroupent par exemple l'obésité, le diabète de type 1 et 2 ou encore le syndrome métabolique. Ces pathologies sont reconnues depuis un certain temps comme des facteurs de risque importants pour la MA (Luchsinger, 2008; Luchsinger and Gustafson, 2009; Profenno et al., 2010).

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique caractérisée par une résistance à l'insuline et une hyperglycémie dont les premiers symptômes apparaissent à l'âge adulte ("Votre guide sur le diabète," 2011). Le DT2 est à différencier du diabète de type 1, qui ne concerne que 10% des diabétiques et se déclare très tôt par l'absence totale de production d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. Le DT2 augmente de deux fois le



risque de développer la MA selon une étude prospective de 1999 (Ott et al., 1999). Il fait partie des cinq comorbidités les plus retrouvées dans la population atteinte de la MA (J.-H. Wang et al., 2018). De plus, il est estimé que le DT2 est responsable d'un cas de démence sur dix, suggérant que les traitements contre le diabète permettraient également de diminuer la prévalence de la MA (Biessels et al., 2006). Les sujets diabétiques ont un plus grand risque de démence et développent des altérations cérébrales similaires à celles observées dans la MA (Daulatzai, 2017) : ils présentent une atrophie cérébrale (Espeland et al., 2013; Manschot et al., 2006), une plus importante pathologie tau et amyloïde que les sujets sains (Y. Liu et al., 2009; Peila et al., 2002) ainsi que des micro-infarctus cérébraux et de la neuroinflammation (Sonnen et al., 2009). Les modèles animaux de diabète présentent également une augmentation de la pathologie tau (El-Khoury et al., 2016; Gratuze et al., 2017a; Kim et al., 2009), et l'apparition d'un phénotype diabétique par l'administration de la toxine streptozotocin dans des modèles animaux de la MA aggrave leur neuropathologie (Gratuze et al., 2017b).

Les désordres métaboliques associés au diabète sont à eux seuls associés à la MA. En effet, d'une part, les niveaux élevés d'hémoglobine glyquée (HbA1c), un marqueur d'équilibre glycémique sur plusieurs mois, sont associés à un plus fort taux d'atrophie cérébrale chez des sujets âgés (Enzinger et al., 2005). Une étude longitudinale sur 7 ans et plus de 2000 participants âgés a montré qu'une glycémie élevée chez des sujets non diabétiques est associée à un plus grand risque de démence (Crane et al., 2013). Cette association était également significative pour les individus diabétiques. D'autre part, la glycémie à jeun est inversement corrélée avec les déficits de mémoire spatiale et le volume hippocampique chez un primate non-humain âgé (Djelti et al., 2016). Finalement, l'hypercholestérolémie en milieu de vie est associée à un plus grand risque de démence à un âge avancé (Knopman et al., 2018a). Ainsi, même sans diabète, les altérations métaboliques ont des répercussions importantes sur le cerveau et le risque de MA.

L'obésité est caractérisée par un surpoids et un excès de masse adipeuse. Elle est définie par un indice de masse corporelle ( $IMC = \text{poids (kg)} / \text{taille (m)}^2$ ) égal ou supérieur à 30. Un IMC élevé est associé à une plus importante perte de matière cérébrale (Enzinger et al., 2005; Jauch-Chara et al., 2015) ainsi qu'à de moins bonnes performances cognitives chez des sujets cognitivement sains (Gunstad et al., 2010). De plus, l'obésité induite par une diète riche en gras aggrave les pathologies tau et amyloïde dans des modèles animaux de la MA (Julien et al., 2010; Leboucher et al., 2013). Chez l'humain, l'obésité à l'âge adulte (en milieu de vie), et non à un âge avancé, est fortement associée au risque de démence (Emmerzaal et al., 2015; Whitmer et al., 2008).

Toutefois, il faut être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus à l'aide de modèles animaux dans un contexte de désordre métabolique. En effet, ces résultats ne sont pas toujours consistants d'une publication à

l'autre car les études diffèrent beaucoup dans la durée, la dose et la source de gras administrée aux animaux, rendant la comparaison des travaux difficile (Gratuze et al., 2016). De plus, peu d'études dans le domaine de la MA réalisent un suivi de la prise de poids et de la prise alimentaire des animaux, ainsi que des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, pourtant nécessaires pour confirmer un phénotype obèse et/ou diabétique dans les modèles murins. En effet, les animaux, tout comme les humains, peuvent être obèses sans développer de diabète ou d'intolérance au glucose, et inversement. Il est fréquent d'observer des animaux ou même un sous-groupe d'animaux résistants à la prise de poids et/ou à l'intolérance au glucose pour diverses raisons (génétiques, qualité de la diète, prise alimentaire inégale, etc).

#### *1.4.2.2.3 Alimentation*

L'alimentation est un facteur environnemental important pour le développement des maladies cardiovasculaires et métaboliques mentionnées ci-dessus. Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses études épidémiologiques aient associé l'alimentation à la démence (Gustafson et al., 2015; Pasinetti et al., 2011; van der Lee et al., 2018). L'alimentation riche en gras est l'une des plus étudiée et accroît le risque de MA (Luchsinger et al., 2002). Toutefois, le suivi et le contrôle stricte de l'alimentation chez l'humain étant très difficile, la plupart des études d'intervention diététique sont réalisées dans des modèles animaux de la MA. Ces études permettent également de mieux comprendre les mécanismes impliqués tout en contrôlant un grand nombre de paramètres (diète identique, environnement, fond génétique, etc). Ainsi, il a été montré qu'une alimentation riche en gras saturés augmente les pathologies tau et amyloïdes dans des modèles murins de MA (Ettcheto et al., 2016; Julien et al., 2010; Leboucher et al., 2013; Theriault et al., 2016; Vandal et al., 2014b). Notre équipe a récemment montré qu'une supplémentation en acides aminés branchés (leucine, valine et isoleucine) combinée à une diète riche en gras saturés exacerbe la phosphorylation de la protéine tau et affecte la survie de la souris triple transgénique (3xTg-AD), un modèle murin de la MA, tandis qu'une restriction de ces acides aminés diminue les déficits cognitifs de ces souris (Tournissac et al., 2018).

À l'inverse, divers aliments protecteurs contre la démence ont été identifiés. Les plus connus et étudiés en neurosciences sont les aliments riches en oméga-3 (poissons, huiles, noix), en polyphénols (petits fruits rouges), et le curcumin pour leurs propriétés antioxydantes et neuroprotectrices (Arsenault et al., 2011; Bensalem et al., 2016; Calon et al., 2004; Dal-Pan et al., 2016; Krikorian et al., 2012; G. P. Lim et al., 2001; J. Wang et al., 2010). De façon plus globale, la diète méditerranéenne comprenant majoritairement des fruits, légumes, noix et légumineuses (riche en oméga-3 et polyphénols) a été étudiée lors d'études cliniques et semble préserver les fonctions cognitives des participants (Gu et al., 2010; Valls-Pedret et al., 2015).

#### 1.4.2.2.4 *Autres facteurs de risque*

D'autres facteurs de risque pour le développement de la MA ont été identifiés et seront brièvement abordés ici. Un des plus important est le niveau d'éducation, souvent mesuré par le nombre d'années de scolarisation (Sando et al., 2008). Dans le même ordre d'idée, les personnes ayant des activités intellectuelles et sociales régulières ont un moins grand risque de développer une démence (Norton et al., 2014). D'autre part, l'inactivité physique est associée à un plus grand risque de MA et des interventions visant à augmenter l'activité physique des personnes âgées semblent prévenir le déclin cognitif des participants (Laurin et al., 2001; Ngandu et al., 2015). Finalement, le tabagisme et la consommation d'alcool sont également des facteurs environnementaux contribuant à élever le risque de MA (Anstey et al., 2007). En effet, une consommation élevée d'alcool a été associée à un plus fort taux d'atrophie cérébrale dans une cohorte d'individus âgés d'environ 60 ans (Enzinger et al., 2005).

## 1.5 Les traitements

Malgré des dizaines d'années de recherche, et plus d'un siècle après la découverte de la MA par Alois Alzheimer, il n'existe aucun traitement curatif aujourd'hui (Gauthier et al., 2016). Les seuls outils pharmacologiques à la disposition des cliniciens sont à visée symptomatique, c'est-à-dire qu'ils vont agir sur les symptômes de la maladie, mais ne permettent pas de freiner ou de modifier l'évolution de la pathologie. Toutefois, des stratégies préventives visant à mieux contrôler les facteurs de risque de la MA démontrent des effets intéressants.

### 1.5.1 La prévention

Il est frappant de constater que de nombreux facteurs de risque pour la MA sont des facteurs environnementaux liés à notre mode de vie occidental, notamment l'alimentation riche en gras et la sédentarité (Winblad et al., 2016). La MA étant une maladie multi-factorielle, l'étude FINGER a expérimenté une intervention multi-domaine de deux ans sur des personnes âgées incluant une diète nordique, de l'exercice physique, un entraînement cognitif et un suivi du risque cardiovasculaire. Les participants ayant suivi l'intervention avaient de meilleures performances cognitives que les sujets contrôles (Ngandu et al., 2015).

Puisqu'il n'existe aucun traitement curatif pour la MA, les stratégies préventives de ce type restent pour le moment le meilleur moyen de diminuer les risques de développer la MA (Sindi et al., 2015; Solomon et al., 2014).

## 1.5.2 Les traitements actuels

Pour le moment, les seuls médicaments approuvés pour la démence sont les inhibiteurs de la cholinestérase (Donepezil (Aricept®), Rivastigmine (Exelon®) et Galantamine (Reminyl®)) et un antagoniste des récepteurs de type acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (Mémantine (Namenda®)) (Anand et al., 2014; Lleó et al., 2006).

### 1.5.2.1 Inhibiteurs de la cholinestérase

L'une des premières hypothèses quant à la pathogenèse de la MA est une dysfonction du système cholinergique. En effet, une diminution des marqueurs de la voie cholinergique a été observée dans les cerveaux d'individus décédés de la MA (Davis et al., 1999; Slotkin et al., 1990). Ainsi, plusieurs inhibiteurs de la cholinestérase, enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, ont été développés et ont montré leurs effets au niveau symptomatique (Anand et al., 2014). Cette classe de médicaments fut la première approuvée pour la démence par la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) en 1995. Leurs effets bénéfiques sont globalement modestes, mais permettent néanmoins de maintenir les fonctions cognitives et parfois même de réduire les symptômes neuropsychiatriques des patients (Trinh et al., 2003). Bien que des effets indésirables soient régulièrement observés, ces traitements permettent dans certains cas de ralentir la progression des symptômes de la MA pour quelques mois, et ainsi de retarder d'environ 20 mois selon certaines études l'entrée des patients en établissement de santé de longue durée (Birks, 2006; Geldmacher et al., 2003). Il faut également noter que le fait de prescrire ces médicaments appelés couramment « anti-Alzheimer » permet une prise de conscience des patients, de leur famille et du personnel médical, ainsi que l'entrée dans un parcours de soin adapté et une meilleure prise en charge.

### 1.5.2.2 Antagoniste des récepteurs NMDA

L'excitotoxicité glutamatergique est un autre élément faisant partie de la pathophysiologie de la MA (Yan Zhang et al., 2016). Bloquer l'activité des récepteurs NMDA à l'aide d'un antagoniste semblait donc une avenue intéressante au niveau thérapeutique. Des essais sur des sujets atteints de démence ont montré une efficacité significative de la mémantine pour réduire l'évolution des symptômes de démence (Hellweg et al., 2012). Toutefois, la mémantine est prescrite seulement dans les stades avancés de la MA. Une combinaison d'inhibiteurs de cholinestérase et de mémantine est également possible dans les cas modérés à sévères de MA (Gauthier and Molinuevo, 2013).

### 1.5.3 Les traitements en essai clinique

Actuellement, 112 molécules sont en essai clinique de phase 1, 2 et 3 pour la MA (Figure 5) (Cummings et al., 2018). Un peu plus de la moitié ont pour but de modifier l'évolution de la maladie, dont un tiers sont des immunothérapies, tandis que le reste vise plutôt à réduire les symptômes de la MA.

L'immunothérapie prend une place importante dans le développement pharmaceutique aujourd'hui. L'idée est que les défenses immunitaires vont permettre de diminuer la neuropathologie Alzheimer. Il existe deux types d'immunothérapie : l'immunothérapie active, qui consiste à stimuler les défenses immunitaires contre un pathogène donné (les peptides A $\beta$  par exemple), et l'immunothérapie passive, qui consiste à administrer des anticorps ciblant directement les protéines tau solubles par exemple (St-Amour et al., 2016). Cette méthode est un succès dans le domaine du cancer (Mellman et al., 2011). Toutefois, dans la MA, de nombreux échecs d'essais clinique de phase 2 et 3 ont eu lieu ces dernières années. Les causes de ces échecs sont diverses, mais on peut mentionner principalement une faible distribution au cerveau des molécules, des participants dans un stade de la MA trop avancé, une hétérogénéité dans la neuropathologie des individus et la nécessité de faire des études longues, et donc coûteuses (Selkoe and Hardy, 2016). Pour faire face à cela, certains ont changé le design des études cliniques en attribuant plusieurs doses de médicament par exemple ou en séparant dès le début les sujets amyloïdes positifs et négatifs (Satlin et al., 2016).

## 2018 Alzheimer's Drug Development Pipeline

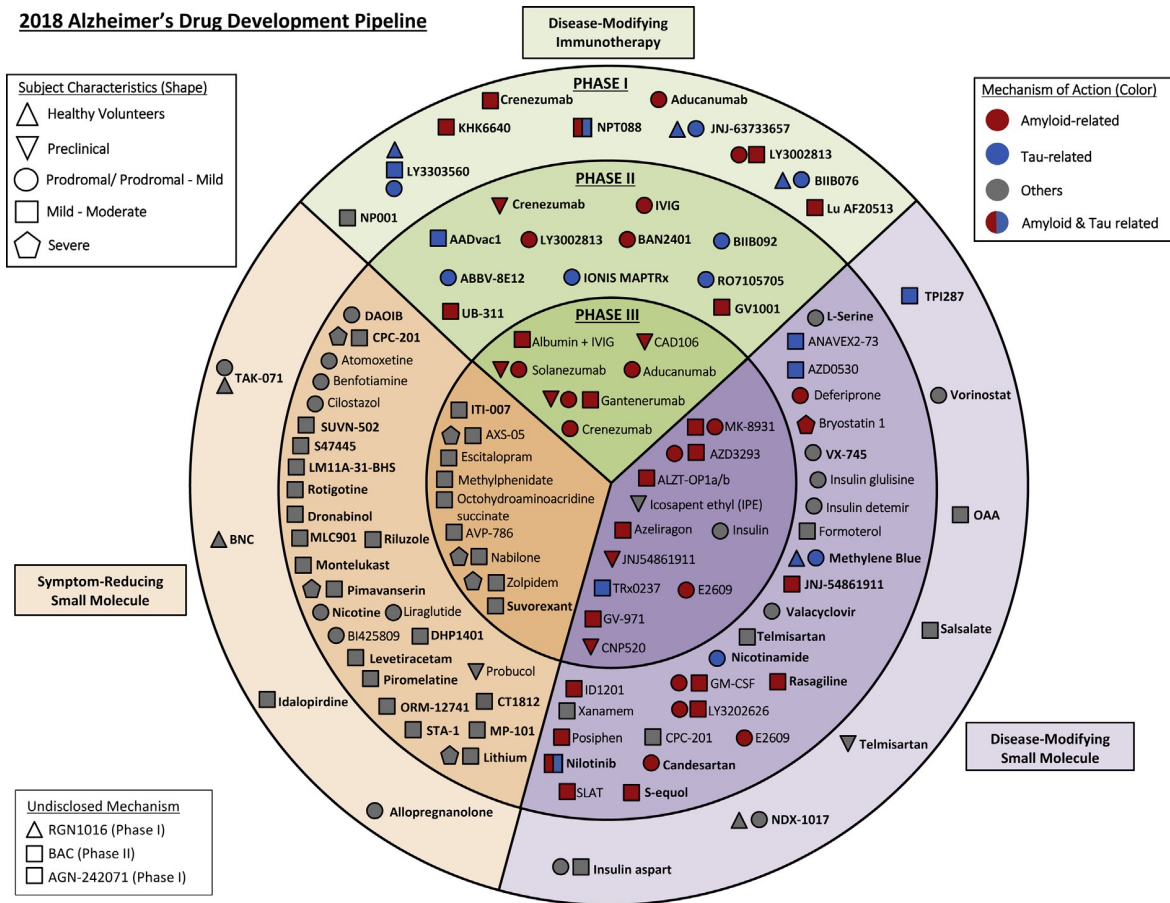


Figure 5. Représentation des différentes études cliniques pour le traitement de la MA en 2018.

Extrait de (Cummings et al., 2018).

Les études cliniques dans la MA sont difficiles car la population Alzheimer est très hétérogène (Anand et al., 2014). Mais surtout, les causes de la forme sporadique ne sont pas connues. Une des plus grande difficulté pour le développement de nouveaux traitements pour la MA est l'absence de diagnostic précoce (Blennow and Zetterberg, 2018; Dubois et al., 2016). Les sujets inclus dans les études sont diagnostiqués sur la base de leurs symptômes cognitifs, mais il est estimé que la neuropathologie a commencé 10 à 15 ans ou plus avant l'apparition des premiers symptômes (Selkoe and Hardy, 2016). Ainsi, le succès des interventions thérapeutiques reste très limité car tenter de diminuer la quantité de plaques amyloïdes ou les ENF dans un cerveau déjà atrophié paraît peu utile. Les recherches actives sur le développement de nouveaux biomarqueurs ainsi que de nouveaux traceurs pour l'imagerie des dépôts amyloïdes et des ENF aideront grandement les futurs essais cliniques et la détection précoce des sujets pouvant bénéficier de traitements

efficaces. Certains pensent qu'il sera nécessaire d'administrer un traitement personnalisé en fonction des comorbidités, de la génétique, du sexe et de l'origine ethnique des sujets (Zissimopoulos et al., 2017). La médecine personnalisée permettra peut-être de mieux cibler les sujets à risque et d'instaurer une stratégie spécifique pour eux. Finalement, puisque l'âge avancé est le principal facteur de risque de la MA, de nouvelles cibles thérapeutiques associées au vieillissement doivent être investiguées afin de faire avancer le développement de nouveaux traitements.

## 1.6 Les modèles animaux de la MA

Les modèles animaux permettent d'étudier de nombreuses hypothèses dans un organisme vivant complet et génétiquement proche de l'humain, tout en contrôlant un grand nombre de facteurs. Ils permettent de mettre en lumière les mécanismes pathogéniques de la MA et d'investiguer des stratégies thérapeutiques diverses. Toutefois, ces modèles sont loin d'être parfaits, et très peu de résultats obtenus chez la souris ont été répliqués chez l'humain (Götz et al., 2018). L'interprétation des résultats précliniques doit être faite avec précaution car la translation vers la clinique n'est pas évidente. Mais surtout, le domaine souffre d'un manque de modèle de la forme sporadique de la maladie, qui représente la très grande majorité des cas de MA.

De nombreux modèles animaux, principalement des souris, ont été développés afin d'étudier la MA. La base de donnée Alzforum contient 166 modèles animaux de MA, dont 162 sont des souris, et seulement 1 (la souris SAMP8) est un modèle spontané (LaFerla and Green, 2012). Les modèles les plus utilisés seront décrits brièvement ici.

### 1.6.1 Les modèles de pathologie amyloïde

Un des modèles animaux de pathologie amyloïde le plus agressif est la souris 5xFAD. Elle présente 5 mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA exprimées sous le promoteur Thy1.2 : les mutations *Swedish*, *Florida* et *London* dans le gène *APP*, ainsi que les mutations M146L et L286V dans le gène *PSEN1* (Oakley et al., 2006). Les plaques amyloïdes sont visibles dès l'âge d'un mois et demi, la neuroinflammation est très importante et des pertes neuronales sont observées à partir de 5 mois. Un des modèles les plus utilisés pour la pathologie amyloïde est la souris APP/PS1. L'insertion de la mutation *APP Swedish* combinée avec *PSEN1dE9* permet l'apparition de plaques dès l'âge de 6 mois (Jankowsky et al., 2004). Les déficits

comportementaux sont nombreux dans cette souris, mais apparaissent à un âge relativement avancé, autour de 12 mois dépendamment du test effectué (Janus et al., 2015). Un autre modèle très connu est la souris J20, qui développe une pathologie étendue de façon rapide ainsi que des troubles de la mémoire précoces, dès l'âge de 4 mois. Cette souris surexprime les mutations *APP Swedish* et *Indiana*, sans mutation dans *PSEN1*, sous le promoteur PDGF- $\beta$  (Mucke et al., 2000).

### 1.6.2 Les modèles de pathologie tau

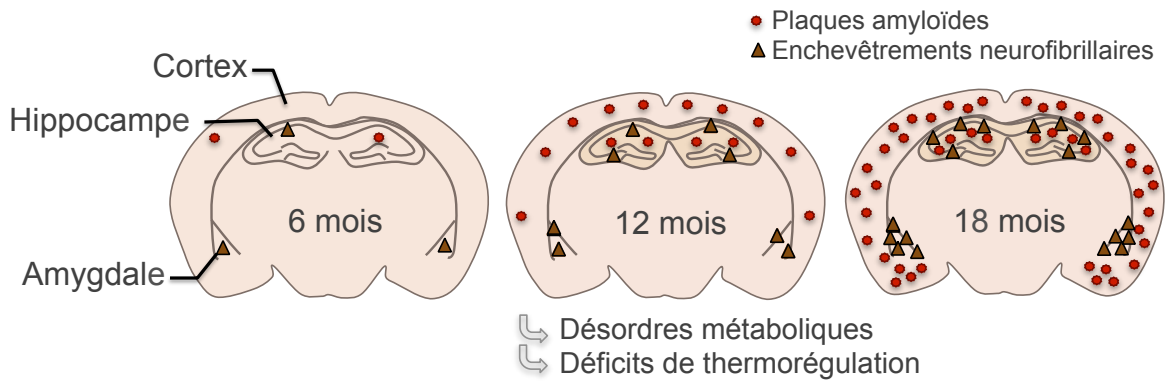
Plusieurs modèles de pathologie tau ont été développés à partir des mutations dans le gène *MAPT* retrouvées dans les démences fronto-temporales, principalement les mutations P301S et P301L (Terwel et al., 2005). La souris surexprimant la mutation P301S de la protéine tau humaine sous le promoteur Thy1 est un modèle de tauopathie sévère, qui développe des ENF dès 4 mois dans le cerveau mais également dans la moelle épinière, induisant la mort des motoneurones et des troubles moteurs majeurs à 5 mois (Allen et al., 2002). Une autre souris portant la mutation P301S, mais sous le promoteur Prnp (*mouse prion protein*) (lignée PS19), développe quant à elle une mort neuronale plus progressive, apparaissant à 9 mois, démontrant l'importance du promoteur dans la création de modèles animaux (Yoshiyama et al., 2007). En revanche, la souris *human Tau* (hTau) présente l'avantage d'exprimer uniquement la protéine tau humaine et non mutée, étant donné qu'aucune mutation dans la protéine tau n'a à ce jour été reliée à la MA (Andorfer et al., 2003). Cette souris est issue du croisement d'une souris tau *knock-out* et d'une souris 8c exprimant la protéine tau humaine (Duff et al., 2000).

### 1.6.3 La souris triple transgénique 3xTg-AD

La souris triple transgénique 3xTg-AD a été créée par le Dr Frank Laferla et est l'un des rares modèles développant à la fois les pathologies amyloïde et tau (Oddo et al., 2003b). Trois transgènes sont exprimés sous le promoteur Thy1.2 : les mutations *APP Swedish*, *PSEN1 M146V* et *MAPT P301L*. Cette surproduction de protéines tau et APP humaines mutées conduit à l'apparition très progressive de plaques amyloïdes principalement dans le cortex frontal, le subiculum et la région CA1 de l'hippocampe, et d'ENF dans le cortex pariéto-temporal, l'amygdale et l'hippocampe (Figure 6) (Oddo et al., 2003a). Il faut attendre au moins 12 mois pour pouvoir bien détecter ces agrégats dans les différentes régions cérébrales des souris 3xTg-AD, ce qui permet d'inclure le facteur de l'âge, si important dans le développement de la MA, dans les expérimentations



avec ce modèle. Toutefois, ce modèle ne présente pas de mort neuronale malgré la présence des deux marqueurs neuropathologiques principaux de la MA.



**Figure 6. Représentation schématique du développement des pathologies amyloïdes et tau dans la souris 3xTg-AD.**

Adapté de (Götz and Ittner, 2008).

Cette souris présente différents déficits comportementaux, notamment une importante anxiété, des troubles de la mémoire de reconnaissance et spatiale (Belfiore et al., 2018; Bories et al., 2012; Filali et al., 2012; Tournissac et al., 2018; Vandal et al., 2016). La souris 3xTg-AD n'est pas considérée comme un véritable modèle de neuroinflammation, mais présente tout de même une astrogliose et une microgliose, ainsi qu'une élévation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires cérébrales (Belfiore et al., 2018; Caruso et al., 2013; St-Amour et al., 2019; 2014). Une diminution de la densité cérébrovasculaire accompagnée d'un élargissement de la lame basale sont présents dans ce modèle (T. M. Do et al., 2014). En revanche, il faut noter que les souris femelles présentent une plus grande quantité de peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42, et donc de plaques amyloïdes (Vandal et al., 2015b). D'autres différences liées au sexe des souris ont été observées au niveau du comportement (Bories et al., 2012; Clinton et al., 2007). Au niveau métabolique, notre équipe a observé l'apparition d'une intolérance au glucose spontanée avec l'âge, de manière plus précoce chez les femelles que les mâles (Vandal et al., 2015b). Quelques équipes ont également rapporté des déficits de thermorégulation, qui seront présentés dans la section 4.2.

#### 1.6.4 Autres modèles animaux

Plusieurs modèles de souris ont été créés à partir des facteurs de risques génétiques identifiés pour la MA, afin de développer des modèles de la forme sporadique de la MA et non la forme familiale. Les premiers modèles développés sont les souris exprimant les trois isoformes d'APOE humaines à la place des protéines murines (Knouff et al., 1999). Il est intéressant de remarquer que la souris APOE4 présente des déficits cognitifs par rapport aux souris APOE2 et APOE3 (Andrews-Zwilling et al., 2010; Traversy et al., 2016). D'autre part, il existe une trentaine de souris différentes basées sur le facteur de risque génétique *TREM2*. Des souris *knock-out* pour *TREM2* ont été créées afin d'étudier la perte de fonction de ce récepteur, et ont été croisées avec différents modèles de pathologie amyloïde ou tau ou encore APOE, tandis que d'autres modèles reposent sur des mutations dans le gène *TREM2* (Kleinberger et al., 2017; Turnbull et al., 2006). La souris SAMP8 (*senescence accelerated mice-prone 8*) présente quant à elle un vieillissement accéléré de manière spontanée ainsi que des déficits cognitifs (Yagi et al., 1988).

Il existe également des modèles non-murins de la MA. Récemment, une étude a montré la présence de neuropathologie de type Alzheimer, c'est-à-dire des ENF en plus des plaques amyloïdes, apparaissant naturellement chez des macaques âgés (Paspalas et al., 2018). Le microcèbe (ou lémurien) représente un modèle sporadique intéressant car il a une durée de vie relativement courte et environ 20% d'entre eux présentent une neurodégénérescence liée à l'âge associée avec des plaques amyloïdes et une pathologie tau (Bons et al., 2006). Ces primates très proches de l'Homme représentent des modèles de choix davantage représentatifs de la forme sporadique de la MA, mais il est difficile et coûteux de travailler avec des primates.

## 2 Les désordres métaboliques observés dans la maladie d'Alzheimer

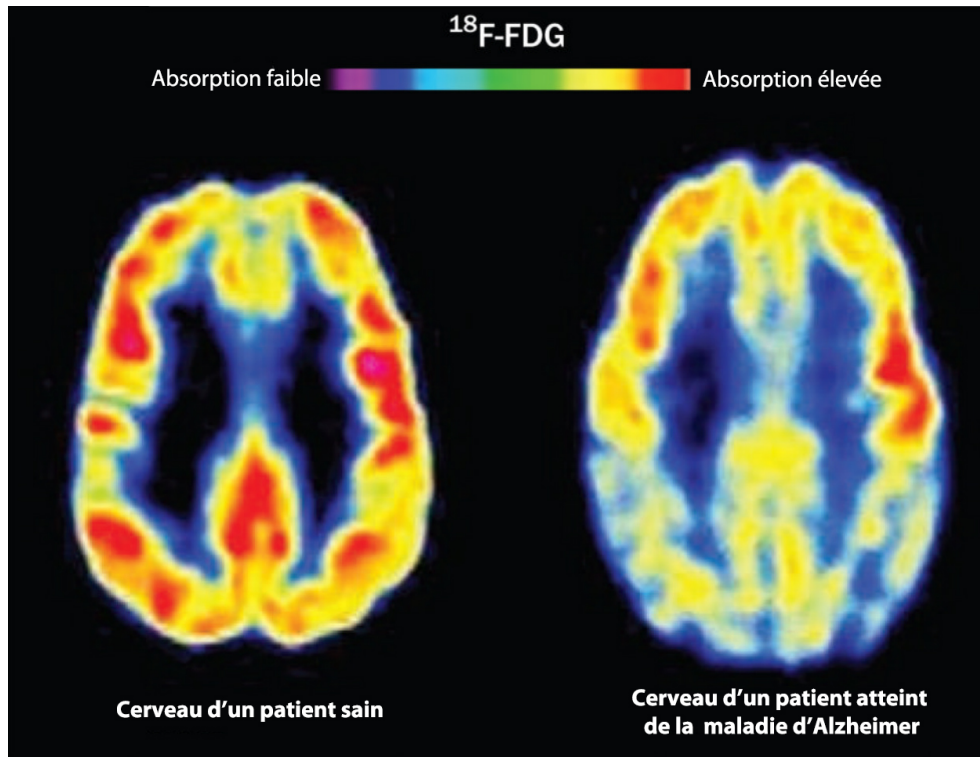
Les liens entre MA et maladies métaboliques, telles que le DT2 et l'obésité, sont maintenant bien établis dans la littérature (De Felice and Ferreira, 2014). Le fait que ces maladies métaboliques soient d'importants facteurs de risque pour la MA a été discuté plus haut. De l'autre côté, il est intéressant de constater que les personnes atteintes de la MA présentent justement des désordres métaboliques au niveau du SNC. D'ailleurs, certains scientifiques vont même jusqu'à renommer la MA le « diabète de type 3 » (Steen et al., 2005). Ces observations suggèrent que diminuer les altérations métaboliques pourrait être bénéfique pour la MA, et ont mené à tester différents antidiabétiques pour le traitement de la MA.

### 2.1 Diminution du métabolisme cérébral du glucose

Le cerveau représente seulement 2% du poids total d'un être humain, mais consomme pourtant 20% de l'énergie du corps, principalement sous forme de glucose (Mergenthaler et al., 2013). Comme il n'existe pas de réserve de glucose dans le cerveau, celui-ci doit le puiser directement dans la circulation sanguine, grâce au transporteur spécifique GLUT1 (*glucose transporter type 1*) situé sur les cellules endothéliales de la vasculature cérébrale et les astrocytes (Simpson et al., 2007). L'importance de ce transporteur pour le fonctionnement cérébral est illustré par le syndrome de déficit de GLUT1, une maladie génétique rare, dont la majorité des individus affectés souffrent d'épilepsie et de retard mental (Leen et al., 2010).

L'une des toutes premières dysfonctions observées dans la MA, qui apparaît d'ailleurs plusieurs années avant les premiers symptômes cognitifs, est la diminution du métabolisme cérébral du glucose (Cunnane et al., 2011; Mamelak, 2012). L'imagerie par <sup>18</sup>F-fluorodésoxyglucose (<sup>18</sup>F-FDG) couplé à la tomographie par émission de positron (FDG-TEP) permet de détecter un hypométabolisme du glucose dès le stade de trouble cognitif léger (Figure 5) (C.-A. Castellano et al., 2014; Mosconi et al., 2005). Cette technique est utilisée dans plusieurs études cliniques, mais est bien trop coûteuse pour faire partie intégrante du diagnostic de la maladie en clinique. Pourtant, la réduction du métabolisme du glucose est de l'ordre de 20 à 25% et est corrélée avec les scores cognitifs des participants (Edison et al., 2007). De plus, le FDG-TEP permet de prédire la conversion des sujets d'un trouble cognitif léger vers la MA ainsi que leur déclin cognitif (Landau et al., 2010).

Certains modèles animaux de la MA, notamment la 3xTg-AD, présentent également une diminution du métabolisme du glucose cérébral (T. M. Do et al., 2014; Nicholson et al., 2010; Niwa et al., 2002).



**Figure 7. Diminution de la captation du glucose au niveau cérébral mesuré par FDG-TEP chez un sujet sain et un sujet atteint de la MA.**

Adapté de (Reitz et al., 2011).

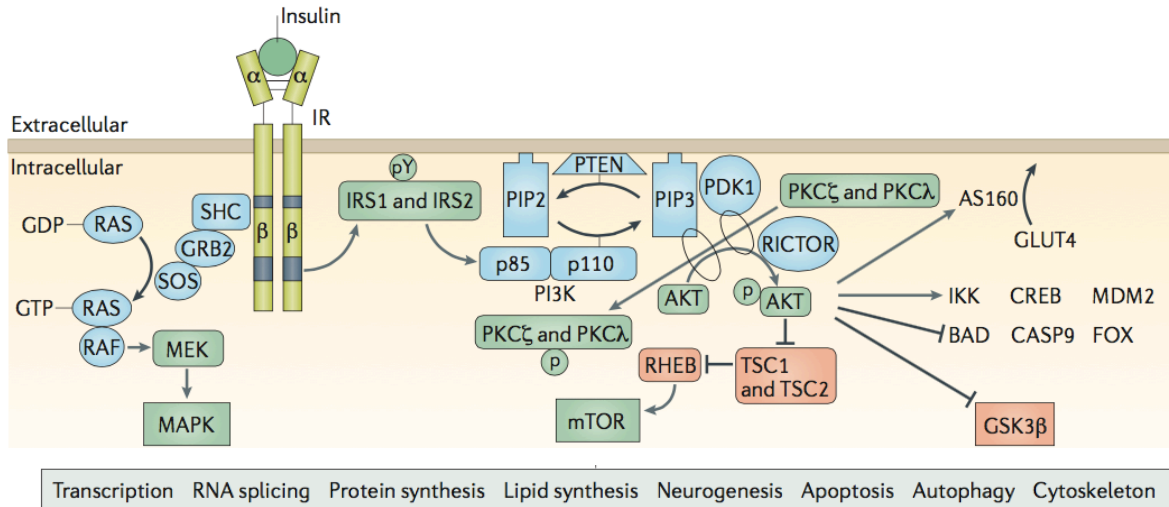
Toutefois, cette diminution est-elle la conséquence d'une réduction de la captation du glucose par le cerveau ou d'un déficit dans son métabolisme cérébral ? Les deux phénomènes ont été rapportés dans la littérature, bien que toutes les études ne soient pas univoques sur la question. D'une part, une réduction des transporteurs du glucose GLUT1 au niveau des cellules endothéliales, mais aussi de GLUT3 au niveau neuronal, ont été rapportées dans des études post-mortem en Western Blot et en immunohistochimie (Y. Liu et al., 2008; Simpson et al., 1994). Ces diminutions sont corrélées avec les niveaux de phosphorylation de tau et les ENF. De plus, une déficience en GLUT1 dans un modèle murin de pathologie amyloïde accélère la neuropathologie et les lésions vasculaires (Winkler et al., 2015). À l'inverse, augmenter la captation cérébrale

du glucose en surexprimant le récepteur GLUT1 augmente la survie et réduit les troubles comportementaux d'un modèle de drosophile de pathologie amyloïde (Niccoli et al., 2016). En revanche, certaines études n'observent pas de diminution de GLUT1 dans les cerveaux de sujets décédés de la MA (An et al., 2018). Ces mesures de transporteurs sont peut-être biaisées par le fait que la surface vasculaire est grandement diminuée chez les sujets atteints de la MA (Bell and Zlokovic, 2009). En effet, il a été montré que l'hypoperfusion cérébrale observée dans la MA est un autre facteur responsable de la diminution d'apport en glucose cérébral (Daulatzai, 2017). D'autre part, une étude sur une quarantaine de cerveaux humains a récemment montré une augmentation des niveaux de glucose cérébraux, accompagnée d'une réduction des enzymes de la glycolyse dans le gyrus temporal de sujets Alzheimer comparativement aux sujets sains, et même chez les sujets asymptomatiques (présentant des scores neuropathologiques élevés mais pas de déficits cognitifs) (An et al., 2018). Les niveaux de glucose et d'enzymes sont d'ailleurs corrélés aux scores neuropathologiques de Braak et de CERAD. Ces événements combinés conduiraient donc à une réduction importante de la principale source énergétique du cerveau, et induirait ainsi un stress métabolique important au niveau des cellules du système nerveux central.

Afin de pallier ces déficits, des diètes céto-gènes ont été étudiées dans la MA. Les cétones sont de petits composés organiques dérivés des acides gras produits par le foie lorsque l'apport de glucose est faible, dans le cas d'un jeûne par exemple (Cunnane et al., 2011). Les corps cétoniques peuvent entrer dans le cerveau et être métabolisés en acétyl-CoA puis fournir de l'énergie sous forme d'ATP grâce aux mitochondries. L'administration d'une diète céto-gène au stade pré-symptomatique et à long terme sur des souris 3xTg-AD permet de diminuer l'anxiété des animaux et de diminuer les dépôts amyloïdes et les ENF (Kashiwaya et al., 2013). En clinique, des effets bénéfiques sur le flux sanguin cérébral ont été observés, mais les effets cognitifs ne semblent pas robustes (Cavaleri and Bashar, 2018; Torosyan et al., 2018).

## **2.2 Résistance à l'insuline centrale**

La présence de récepteurs à l'insuline (INSR) au niveau neuronal et endothélial dans plusieurs régions du cerveau montre que cette hormone joue un rôle crucial pour le fonctionnement cérébral (Fernandez and Torres-Alemán, 2012). En effet, l'insuline au niveau cérébral est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules nerveuses, la plasticité synaptique et la régulation du métabolisme énergétique (Kleinridders et al., 2014). La signalisation de l'insuline au niveau central est similaire à la signalisation périphérique.



**Figure 8. Signalisation de l'insuline.**

Le récepteur à l'insuline est constitué de deux sous-unités  $\beta$  intra-membranaires et de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires. Son activation par autophosphorylation conduit à deux voies différentes : la voie PI3K/AKT, et la voie MAPK. Schéma adapté de (Arnold et al., 2018).

**Abréviations :** AKT : *protein kinase B (PKB)*; AS160: *AKT substrate of 160 kDa*; BAD: *Bcl2-associated agonist of cell death*; CASP9 : *caspase 9*; CREB : *cAMP-responsive element-binding protein*; FOX : *Forkhead box protein*; GLUT4: *glucose transporter type 4*; GRB2 : *growth factor receptor-bound protein 2*; GSK3 $\beta$  : *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ; IKK : *inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase*; IR : *insulin receptor*; IRS : *insulin receptor substrate*; MDM2 : *E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2*; MAPK : *mitogen-activated protein kinase*; mTOR : *mammalian target of rapamycin*; PDK1 : *3- phosphoinositide-dependent protein kinase-1*; PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*; pY: *tyrosine residues*; PIP2 : *phosphatidylinositol 4,5- biphosphate*; PIP3 : *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*; PKC $\zeta$  : *protein kinase C $\zeta$* ; PKC $\lambda$  : *protein kinase C $\lambda$* ; PTEN : *phosphatase and tensin homolog*; RICTOR : *rapamycin-insensitive companion of mTOR*; SHC : *SHC-transforming protein*; SOS : *son of sevenless homologue*; TSC1, hamartin; TSC2, tuberin.

La résistance à l'insuline se caractérise par un déficit de réponse de la signalisation suite à la liaison de l'hormone à son récepteur, et est accompagnée d'une hyperinsulinémie (Goldstein, 2002). Plusieurs études tendent à montrer un tel phénomène au niveau central dans la MA, mais encore, les résultats ne sont pas unanimes (Arnold et al., 2018). D'une part, des perturbations dans les niveaux d'insuline et de ses facteurs de croissance (IGF-1, IGF-2, IGFBP-2) sont observés chez les individus Alzheimer (Steen et al., 2005). Ces

perturbations surviennent avec l'évolution du stade de Braak (Rivera et al., 2005). Une étude sur 39 sujets a montré une diminution d'insuline dans le LCR conjointement avec une augmentation dans le plasma des sujets atteints de la MA par rapport aux sujets sains (Craft et al., 1998). En revanche, une étude a observé des niveaux d'IGF-2 et d'IGFBP-2 plus élevés dans le LCR des hommes dans les stades précoces de MA, mais pas chez les femmes, qui corrèlent positivement avec les niveaux de tau dans le LCR (Åberg et al., 2015). D'autre part, la réponse cérébrale à l'insuline mais également à IGF-1 est diminuée dans le cerveau de sujets décédés de la MA par rapport aux contrôles, de la même façon que dans les sujets diabétiques (Y. Liu et al., 2011; Talbot et al., 2012). Certaines études ont observé une diminution du récepteur à l'insuline (Steen et al., 2005), mais pas toutes (Moloney et al., 2010; Talbot et al., 2012). Des perturbations dans les niveaux des kinases subséquentes à l'activation du récepteur à l'insuline, principalement AKT et GSK3 $\beta$ , ont été observées à plusieurs reprises chez l'humain (Griffin et al., 2005; Hooper et al., 2008; Rickle et al., 2004; Steen et al., 2005). La signalisation de l'insuline cérébrale est également perturbée dans certains modèles murins de la MA (Ruiz et al., 2016). D'ailleurs, des dépôts amyloïdes sont retrouvés dans le pancréas de la souris 3xTg-AD (Vandal et al., 2014b).

## **2.3 Repositionnement thérapeutique de médicaments antidiabétiques dans la MA**

Les liens entre DT2 et MA sont très forts, et les sujets Alzheimer présentent des troubles métaboliques importants. Ces observations ont donc mené à tenter de repositionner les médicaments antidiabétiques disponibles en clinique dans le cadre de la MA (Yarchoan and Arnold, 2014). Ici, seuls l'insuline, les thiazolidinediones et les analogues de GLP-1 (*Gucagon-like peptide-1*) seront abordés car ce sont les médicaments les plus utilisés dans le diabète.

### **2.3.1 Insuline**

L'insuline est testée au niveau préclinique et clinique dans la MA depuis plusieurs années maintenant. D'une part, les études précliniques dans des modèles animaux de la MA ont montré des effets bénéfiques sur la mémoire, la neuroinflammation et la pathologie amyloïde (Adzovic et al., 2015; Chen et al., 2014b; Mao et al., 2016; Rajasekar et al., 2016; Vandal et al., 2014b). Une étude de notre équipe a notamment montré qu'une injection intrapéritonéale d'insuline (1 UI/kg) améliorerait les performances cognitives de la souris 3xTg-AD et

qu'une administration intraveineuse à forte dose (3,8 UI/kg) augmentait grandement la clairance des peptides A $\beta$  du cerveau vers le sang en seulement 5 minutes (Vandal et al., 2014b). De manière plus générale, divers éléments de la voie de signalisation de l'insuline sont impliqués dans la clairance des peptides A $\beta$  du cerveau ((Swaminathan et al., 2017); pour revue : (Vandal et al., 2015a)).

La voie intranasale a été sélectionnée en clinique afin de permettre une administration centrale plus directe et éviter que l'hormone atteigne la périphérie, et ainsi les risques d'hypoglycémie (Born et al., 2002; Freiherr et al., 2013). Toutefois, la présence d'insuline dans la circulation après injection intranasale n'a été que peu étudiée. Les quelques travaux ayant directement investigué cet aspect montrent que l'injection intranasale de macromolécules mène tout de même à une exposition systémique (ex : IGF-1, immunoglobuline G, interféron  $\beta$ ) (N. N. Kumar et al., 2018; Lochhead and Thorne, 2012; Thorne et al., 2008; 2004). En clinique, l'insuline administrée par voie intranasale a montré des effets bénéfiques sur la cognition de sujets atteints de la MA (Benedict et al., 2004; Claxton et al., 2015; Craft et al., 2012; Shemesh et al., 2012). Toutefois, dans l'étude de Claxton et collaborateurs, les sujets porteurs de l'APOE4 présentaient au contraire une détérioration de leurs scores cognitifs suite à l'administration d'insuline. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'insuline induit une augmentation de la phosphorylation de tau dans des souris exprimant la forme humaine de l'APOE4 (Traversy et al., 2016). Des études cliniques avec l'insuline sont toujours en cours pour la MA, mais avec différentes formulations d'insuline permettant une plus longue demi-vie par exemple (Cummings et al., 2018). Toutefois, les résultats préliminaires de l'étude clinique placebo-traitement « SNIFF » avec de l'insuline intranasale pendant un an sur 240 sujets atteints de trouble cognitif léger ou MA ne montrent pas d'effet sur la cognition (NCT01767909; communiqué de Alzforum sur le *Clinical Trials on Alzheimer's Disease Conference* 2018).

### 2.3.2 Les thiazolidinediones

Les thiazolidinediones (TZD) sont une famille de molécules antidiabétiques qui activent le récepteur *peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) (Rendell and Kirchain, 2000). Les deux TZD approuvées pour le DT2 et étudiées dans la MA sont le pioglitazone et le rosiglitazone. Une étude prospective a montré que la consommation de pioglitazone diminuait de 47% le risque de démence chez les sujets diabétiques (Heneka et al., 2015b).

Au niveau mécanistique, les agonistes de PPAR $\gamma$  augmentent la dégradation des peptides A $\beta$  par une activation de la phagocytose des microglies et les niveaux d'APOE dans le parenchyme cérébral (Mandrekar-Colucci et al., 2012). Chez la souris APP/PS1 de 12 mois, neuf jours de gavage avec du pioglitazone (80mg/kg) suffisent à réduire significativement les plaques amyloïdes et les déficits cognitifs. En revanche, un



traitement de 2 mois avec le pioglitazone réduit les déficits cérébrovasculaires chez la souris J20 âgée de 16 mois, mais n'a pas d'effet sur la pathologie amyloïde ni les déficits cognitifs (Nicolakakis et al., 2008). Un autre agoniste de PPAR, le GFT1803, a montré des effets bénéfiques supérieurs au pioglitazone chez la souris APP/PS1 de 6 mois au niveau neuropathologique et comportemental (Kummer et al., 2015).

Chez l'humain, les résultats sont plus mitigés. Une étude pilote sur 30 sujets atteints de la MA a montré que les participants ayant reçu six mois de traitement avec le rosiglitazone avaient de meilleurs scores cognitifs que le groupe ayant reçu le placebo (Watson et al., 2005). Toutefois, des études cliniques de phase 3 n'ont pas permis de répliquer un effet significatif du traitement (Yarchoan and Arnold, 2014). Par ailleurs, un traitement de 6 mois avec du pioglitazone sur 15 individus diabétiques et atteints de trouble cognitif léger a permis d'améliorer leurs performances cognitives (Hanyu et al., 2009). Une étude de phase 3 sur plus de 3000 sujets appelée « TOMORROW » (NCT01931566) est en cours avec de légères doses de pioglitazone et vise à déterminer si le traitement sur des sujets à risque de développer la MA permet de retarder le diagnostic de la maladie (Roses et al., 2014). Finalement, une méta-analyse des études randomisées contrôles suggère que le pioglitazone serait efficace pour les individus présentant la MA et un diabète, mais les résultats avec le rosiglitazone ne seraient pas concluants (J. Liu et al., 2015).

### 2.3.3 Analogues de GLP-1

Le GLP-1 est une incrétiline utilisée dans le traitement du DT2 pour réguler la glycémie en stimulant la production d'insuline du pancréas (Drucker and Nauck, 2006). La demi-vie du GLP-1 étant de quelques minutes seulement, des analogues de cette hormone ont été développés pour être compatibles avec une utilisation thérapeutique. Il existe deux analogues sur le marché pour le moment : l'exénatide et le liraglutide. Depuis environ 20 ans, des études ont commencé à démontrer un potentiel thérapeutique de la voie GLP-1 dans le SNC et la MA (Perry and Greig, 2004). Différents auteurs ont rapporté des effets bénéfiques des analogues de GLP-1 au niveau de la mémoire, de l'hyperphosphorylation de tau, de la quantité de peptides A $\beta$ , de la perte synaptique ainsi que de la neuroinflammation dans des modèles animaux (Hansen et al., 2015; Ma et al., 2015; McClean et al., 2011; L. Shi et al., 2017; Tai et al., 2018). Chez l'Homme, une étude sur 38 sujets Alzheimer a montré que 6 mois de traitement avec le liraglutide augmentait la captation du glucose au cerveau par rapport au groupe contrôle (Gejl et al., 2017; 2016). Trois études cliniques de phase 1 et 2 sont en cours, ou les résultats ne sont pas encore publiés, pour tester l'efficacité du liraglutide dans la MA (Étude ELAD, NCT01843075; NCT02140983 et NCT01469351).

Toutefois, aucun de ces médicaments antidiabétiques n'a pour le moment passé les essais cliniques de phase 3 pour la MA. Peut-être qu'il est nécessaire de cibler des sous-populations atteintes de troubles métaboliques pour observer un effet bénéfique de cette classe de médicament. Considérant les liens très étroits entre maladies métaboliques et MA, de nouvelles molécules permettant de diminuer les désordres métaboliques restent à investiguer dans la MA. Des molécules multi-cibles pour toucher les différents paramètres impliqués dans la pathogenèse de la MA semblent requises pour cette maladie multifactorielle.

## 3 La thermorégulation

La thermorégulation désigne l'ensemble des mécanismes permettant au corps de réguler sa température. Elle est intimement liée au métabolisme énergétique et est altérée chez les personnes âgées. Les deux prochaines sections visent à expliquer pourquoi elle pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante pour modifier à la fois les désordres métaboliques et la MA.

### 3.1 Définition

La température corporelle est un paramètre biologique extrêmement bien régulé chez l'Homme (Mekjavic and Eiken, 2006). En effet, de trop grandes variations de température ont des effets délétères importants sur le fonctionnement du corps humain : une hyperthermie, c'est-à-dire une température corporelle anormalement élevée, peut induire des lésions irréversibles, notamment pour le SNC (Walter and Carraretto, 2016); tandis qu'une hypothermie (température corporelle en dessous des 35°C) conduit à une diminution de la pression artérielle causant dans certains cas une hypoperfusion tissulaire et une diminution de la réponse immunitaire (Doufas, 2003). Le maintien de la température corporelle autour des 37°C a tout de même un coût métabolique très important : près de la moitié de la dépense énergétique d'un humain en condition d'activité normale est consacrée à maintenir l'homéothermie (Landsberg, 2012).

La température corporelle varie au cours de la journée selon un cycle circadien. Le rythme circadien du corps regroupe l'ensemble des mécanismes biologiques cycliques qui varient au cours d'une journée de 24 heures, comme par exemple l'alternance veille/sommeil, la pression sanguine, l'état de vigilance et le métabolisme (Hofstra and de Weerd, 2008). Pour ce qui est de la température du corps, celle-ci varie de quelques degrés au cours de la journée : elle est plus élevée à la fin de la journée, en raison de l'activité musculaire, et elle est plus basse dans la nuit, car le corps est inactif pour plusieurs heures (Refinetti and Menaker, 1992).

La thermorégulation désigne l'ensemble des mécanismes qui permettent au corps de maintenir une température autour d'une valeur seuil, environ 37°C pour l'Homme. Les mécanismes comprennent la thermolyse, c'est-à-dire la diffusion de chaleur, mais aussi la thermogenèse, la production de chaleur (voir section 3.3) (Cannon and Nedergaard, 2004). Cette capacité à réguler la température interne en produisant soi-même de la chaleur concerne les organismes dits endothermes, c'est-à-dire les mammifères et les oiseaux (Silva, 2006). Par opposition, les organismes ectothermes comme les reptiles ou les poissons n'ont pas ou

peu de capacité de production de chaleur et vont réguler leur température interne grâce aux changements de température externe. Le comportement joue également un rôle important dans la thermorégulation : la façon de s'habiller en fonction de la température externe, le rapprochement des souris dans une même cage ou encore le fait de se déplacer vers un environnement plus frais ou chaud en font partie (Gordon et al., 1998). Toutefois, ces aspects ne seront pas abordés dans les sections suivantes afin de se concentrer sur la régulation physiologique de la température corporelle.

La thermoneutralité (ou zone thermoneutre) correspond à la température externe à laquelle un organisme n'a pas besoin de produire de chaleur en plus de celle issue du métabolisme basal (Cannon and Nedergaard, 2010). Cette zone varie d'un animal à l'autre, et même au sein d'une même espèce en fonction de l'âge par exemple. La thermoneutralité chez l'Homme est située entre 22 et 25°C, tandis qu'elle est autour des 28-30°C pour la souris (Speakman and Keijer, 2013).

## **3.2 Régulation centrale de la température corporelle**

### **3.2.1 La détection par les thermorécepteurs**

Les changements de température externe sont détectés par des thermorécepteurs ou *temperature-activated transient receptor potential* (TRP). Ce sont des structures sensibles à la température qui alertent le système central d'une sensation de froid ou de chaud. Ces signaux sont indispensables pour le confort mais aussi et surtout pour la survie de l'individu (Patapoutian et al., 2003). Leur activation induit une réponse avant même que la température centrale ait réellement changé (Morrison et al., 2012). Les thermorécepteurs sont retrouvés à différents endroits du corps : en périphérie (peau, système nerveux périphérique), au niveau interne (intestin, foie) et même dans l'hypothalamus (Song et al., 2016). Les fibres nerveuses afférentes qui conduisent les signaux thermiques sont des fibres A $\delta$ , qui sont légèrement myélinisées, de diamètre moyen et à conduction rapide; et des fibres C, qui sont non myélinisées, de petit diamètre et à conduction plus lente (Julius and Basbaum, 2001).

Au niveau cutané, il existe différents types de récepteurs TRP qui sont chacun activés spécifiquement par leur propre gamme de température; ensemble, ils couvrent la presque totalité des températures que les mammifères peuvent sentir (Caterina, 2007). En particulier, le récepteur TRPM8 est un récepteur cutané qui détecte les sensations de froid, c'est-à-dire les températures situées en dessous de 27°C (Dhaka et al., 2007; McKemy et al., 2002). Les récepteurs TRPV4 et TRPV3 quant à eux participent à la détection de températures

chaudes, entre 27 et 42°C au niveau cutané (H. Lee et al., 2005; Moqrich et al., 2005). Le récepteur TRPV4 est également impliqué dans la thermogenèse : il est présent dans les zones préoptique et antérieure de l'hypothalamus (Abe et al., 2003; Hori et al., 1999). Finalement, les informations des thermorécepteurs vont être intégrées au niveau central par la zone préoptique de l'hypothalamus pour induire la thermolyse (évacuation de la chaleur) ou la thermogenèse (production de la chaleur) (Nakamura and Morrison, 2008).

### 3.2.2 Intégration centrale du signal par l'hypothalamus

L'hypothalamus est situé dans la région ventrale du cerveau, au-dessus de la zone du tronc cérébral et près du troisième ventricule (D. Richard, 2015). Il est en étroite relation avec l'hypophyse et contribue à faire le lien entre le système nerveux central et le système endocrinien. L'hypothalamus est également impliqué dans la régulation de l'appétit et de la dépense énergétique (Coll and Yeo, 2013). Il est composé de plusieurs sous-régions, mais on peut grossièrement distinguer l'hypothalamus postérieur de l'hypothalamus antérieur. La partie postérieure est impliquée dans la thermogenèse, alors que la région antérieure de l'hypothalamus participe à la thermolyse.

De façon plus détaillée, lors d'une sensation de froid, les afférences glutamatergiques des thermorécepteurs de la peau passent par la corne dorsale de la moelle épinière et stimulent les interneurons GABAergiques du noyau préoptique médian (MnPO) (voie complète schématisée dans la Figure 9) (Labbé et al., 2015b; Morrison et al., 2012). Ces derniers inhibent les neurones GABAergiques de la zone préoptique (POA) de l'hypothalamus, qui projettent vers la zone dorsomédiale de l'hypothalamus (DMH) : leur inhibition sur les neurones glutamatergiques de la DMH est donc diminuée. Ces derniers vont alors projeter vers la médulla ventromédiale rostrale (RVM), plus précisément dans le noyau du raphé pallidus rostral (RPar), où les neurones glutamatergiques vont stimuler les neurones pré-ganglionnaires du système nerveux sympathique dans le noyau spinal intermédiolatéral (IML). Finalement, les afférences sympathiques post-ganglionnaires vont relâcher la norépinephrine dans les terminaisons synaptiques situées sur les adipocytes du tissu adipeux brun (TAB); le neurotransmetteur va alors stimuler les récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques et induire en bout de ligne la production de chaleur par les mitochondries du TAB (décrit plus bas) ainsi que la lipolyse au sein des adipocytes blancs (Cannon and Nedergaard, 2004). Il faut toutefois noter que l'activation du TAB ne joue pas un rôle prépondérant dans la thermogenèse chez l'adulte, la quantité de TAB chez l'humain étant limitée (discuté plus bas).

À l'inverse, la sensation de chaleur active les thermorécepteurs spécifiques de la peau et induit une réponse opposée à celle de la sensation de froid, c'est-à-dire une inhibition des neurones sympathiques innervant le

TAB. Cette réponse se réalise en empruntant la même voie centrale que décrite ci-dessus, mais en stimulant des neurones différents. En effet, la principale différence est que les afférences périphériques glutamatergiques stimulent les neurones glutamatergiques du MnPO, qui activent subséquemment les neurones GABAergiques de la POA, qui vont alors inhiber les voies subséquentes (Figure 8) (Morrison et al., 2012).

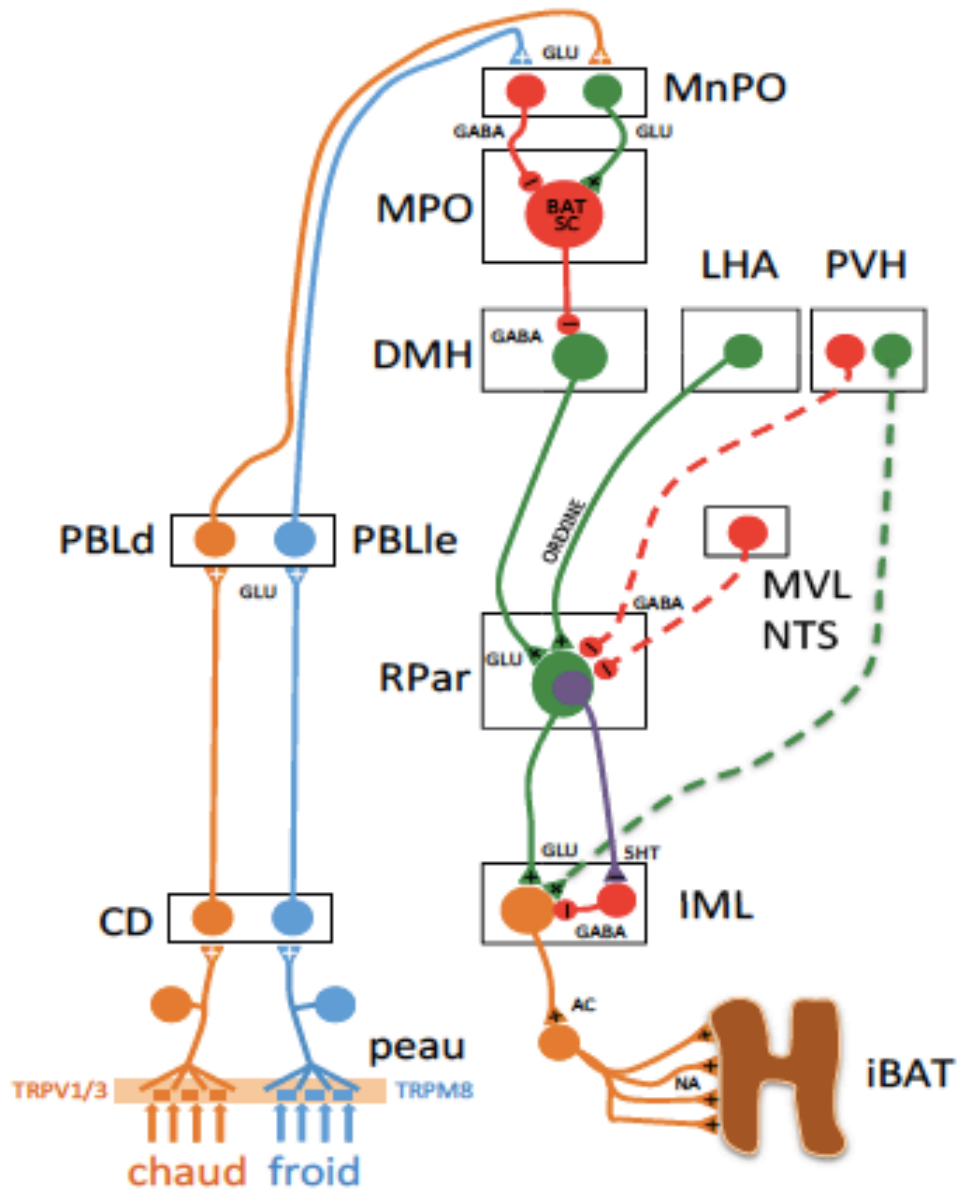


Figure 9. Schéma de la voie de régulation centrale de la thermogenèse du tissu adipeux brun.

**Abréviations** : 5HT : sérotonine; AC : acétylcholine; BAT SC : neurone sensible au chaud; CD : corne dorsale; DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus; GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique; GLU : glutamate; iBAT : tissu adipeux brun interscapulaire; IML : colonne intermédiolatérale de la moelle épinière; LHA : hypothalamus latéral; MnPO : noyau préoptique médian; MPO : noyau préoptique médial; MVL : médulla ventrolatérale; NA : noradrénaline; NTS : noyau du tractus solitaire; PBLd : noyau parabrachial latéral (dorsal); PBLle : noyau parabrachial latéral (latéral externe); PVH : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; RPar : noyau du raphé pallidus rostral; TRPV1/3 et TRPM8 : *transient receptor potential V1/3 and M8*. Tiré de la thèse du Dr Monge-Roffarello, adapté et traduit de (Morrison et al., 2012).

L'hypothalamus est également impliqué dans le rythme circadien de la température. En effet, le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus est synchronisé avec l'environnement : le noyau suprachiasmatique reçoit des afférences rétinienne, ce qui lui permet de synchroniser l'activité de ses neurones en fonction de la lumière perçue par l'individu (Brown and Piggins, 2007; Ralph et al., 1990). Ce noyau joue un rôle dans la stimulation sympathique de différents organes tels que le TAB, mais aussi la glande thyroïde, les reins, la vessie et la rate (Bartness et al., 2001).

### **3.3 Régulation périphérique de la température corporelle**

#### **3.3.1 Thermolyse**

La thermolyse désigne l'ensemble des mécanismes permettant de dissiper la chaleur et diminuer la température corporelle (Kenny and Journeay, 2010). La chaleur corporelle s'évacue sous différentes façons : par radiation (transfert de chaleur sous forme d'ondes), convection (transfert de chaleur vers un gaz ou un fluide de plus basse température), conduction (transfert de chaleur par contact), ou évaporation (transfert de chaleur par la transformation d'un liquide en vapeur) (Krau, 2013; N. A. S. Taylor, 2014).

Dans des conditions normales, la température corporelle se dissipe principalement sous le phénomène de radiation, mais cette perte est compensée par la chaleur produite par le métabolisme, maintenant ainsi un équilibre (Mekjavic and Eiken, 2006). En revanche, en condition d'hyperthermie, le corps va utiliser en premier lieu la convection : lorsque la température corporelle augmente, les vaisseaux sanguins périphériques vont se dilater afin d'augmenter la surface d'échange pour diffuser la chaleur vers l'environnement (Mack et al., 1995).

Cette vasodilatation entraîne une augmentation de la quantité de sang au niveau périphérique et une augmentation de la pression artérielle. Le débit sanguin cutané peut atteindre 6 litres par minute en condition de stress thermique intense, alors qu'il est de 300 ml par minute en condition normale (Smith and Johnson, 2016). Dans un deuxième temps, c'est l'évaporation sous forme de sueur (transpiration) qui intervient pour évacuer la chaleur chez l'Homme. Tout ceci est, comme la thermogenèse, régulé par le système nerveux sympathique (Madden and Morrison, 2018). Toutefois, toutes les voies au niveau du contrôle central ne sont pas encore connues (Smith and Johnson, 2016).

Chez le rongeur, la vasodilatation au niveau de la queue est le principal mécanisme de thermolyse (Fischer et al., 2016; Warner et al., 2013; A. A. Young and Dawson, 1982). Une étude récente a montré qu'une mauvaise régulation de la vasoconstriction de la veine caudale chez la souris déficiente en thermorécepteur TRPM8, sans déficit de thermogenèse, est responsable de l'hypothermie et d'une diminution de la capacité d'adaptation à une exposition au froid (Reimúndez et al., 2018).

Dans les premières phases de l'hyperthermie induite par une fièvre, le système immunitaire s'active et conduit à l'augmentation de la température corporelle nécessaire à l'élimination des pathogènes. Il semblerait que le TAB participe également à cette augmentation de température au stade précoce de la pyrexie (Cannon and Nedergaard, 2004). En effet, son activité est augmentée dans les trois premières heures de fièvre (Harris et al., 1985). Pour expliquer ce phénomène, des études ont montré qu'une injection de la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>), produite par le système immunitaire en réponse à un pathogène, active le TAB en quelques minutes seulement (Amir and Schiavetto, 1990; Ootsuka et al., 2008; Steiner et al., 2006).

### 3.3.2 Thermogenèse et tissu adipeux brun

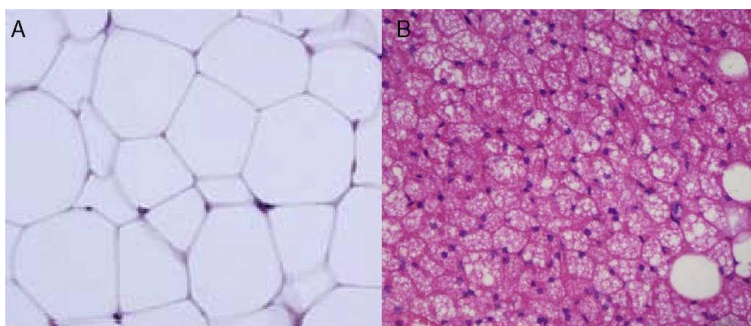
Il existe deux types de thermogenèse : la thermogenèse dite obligatoire et la thermogenèse dite facultative ou adaptative. La première désigne la production de chaleur issue du métabolisme basal du corps, c'est-à-dire produite par les réactions métaboliques libérant de la chaleur (Silva, 2006). La thermogenèse facultative regroupe quant à elle la chaleur produite par les muscles (activité physique ou thermogenèse avec frissons), par la digestion (thermogenèse induite par l'alimentation) et par le TAB (thermogenèse sans frissons), plus connu sous le nom de graisse brune (Cannon and Nedergaard, 2004; D. Richard and Picard, 2011). Cette section va se concentrer sur la thermogenèse sans frissons du TAB.

Le TAB est présent en grande quantité chez les rongeurs et les animaux qui hibernent, principalement au niveau interscapulaire (Cannon and Nedergaard, 2004). Chez l'Homme, on le retrouve au stade embryonnaire



et chez le nourrisson au niveau interscapulaire et supraclaviculaire principalement (Cypess et al., 2013; Enerbäck, 2010). Son rôle et son activité ont longtemps été négligés chez l'adulte, jusqu'en 2009, date à laquelle plusieurs études simultanées ont mis en évidence pour la première fois que ce tissu était fonctionnellement actif chez l'humain adulte, grâce à la technique de TEP couplée à la tomодensitométrie (TEP-TDM) au  $^{18}\text{F}$ -FDG (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Cette découverte majeure a relancé les recherches sur ce tissu adipeux particulier, notamment dans le domaine du diabète et de l'obésité, comme discuté à la section 3.4 (Dulloo, 2011; Hanssen et al., 2015a; Mattson, 2010; Xiao et al., 2015).

Le TAB est composé d'adipocytes bruns qui contiennent de nombreuses mitochondries et gouttelettes lipidiques de petite taille. Il est donc morphologiquement différent du tissu adipeux blanc dont les adipocytes sont composés de grosses vacuoles lipidiques et de peu de mitochondries (Figure 10) (Saely et al., 2012). Ces deux tissus se distinguent principalement par leur fonction, l'un stockant l'énergie (blanc) et l'autre l'utilisant pour produire la chaleur (brun) (D. Richard and Picard, 2011). Le TAB est également très vascularisé, permettant ainsi une rapide diffusion de la chaleur produite vers le reste du corps par le système sanguin (Orava et al., 2011). La protéine *uncoupling protein 1* (UCP1) est le marqueur caractéristique du TAB (Nedergaard et al., 2001).



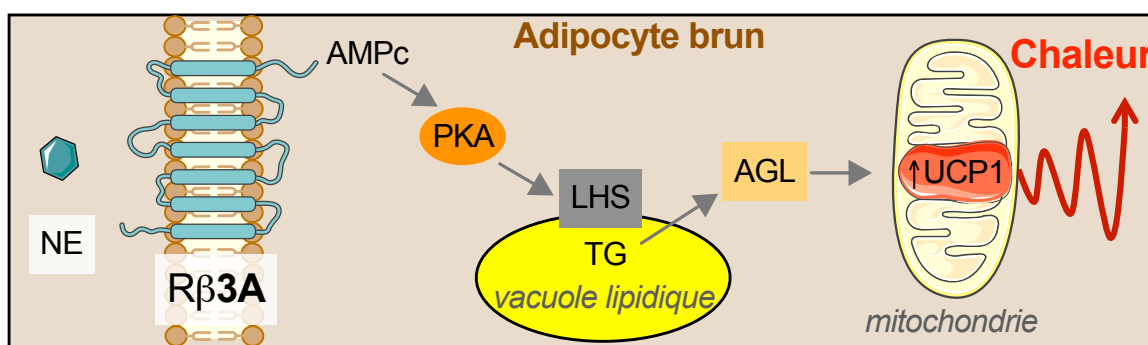
**Figure 10. Morphologie des tissus adipeux blancs et bruns.**

Coloration des cellules adipeuses à l'hématoxyline et éosine. A : tissu adipeux blanc ; B : tissu adipeux brun. Extrait de (Esteve Ràfols, 2014).

De récentes études ont rapporté un type de tissu adipeux intermédiaire entre le blanc et le brun : le tissu adipeux beige (Harms and Seale, 2013). En effet, des adipocytes blancs exprimant la protéine UCP1 sont retrouvés au sein de la masse adipeuse d'animaux ayant une activité thermogène augmentée (Poher et al.,

2015). Toutefois, ce tissu intermédiaire semble être peu recruté en condition de stimulation adrénergique chez le rongeur, ou du moins de manière plus limitée par rapport au TAB pur (Labbé et al., 2016).

Lors de la production de chaleur, la norépinephrine est relâchée par les boutons synaptiques du système nerveux sympathique provenant de l'hypothalamus (décrit en 3.2.2). Le neurotransmetteur stimule les récepteurs  $\beta 3$  adrénergiques ( $R\beta 3A$ ) situés à la surface des adipocytes bruns. Par une cascade d'activation, il se produit alors une lyse des triglycérides contenus dans les adipocytes bruns, une activation d'UCP1 (ou thermogénine) sur la membrane interne des mitochondries. Cette protéine va créer un découplage de la pompe à proton des mitochondries conduisant à la production de chaleur (Figure 11) (Cannon and Nedergaard, 2004; Golozoubova et al., 2001).



**Figure 11. Cascade d'activation de la thermogénèse du tissu adipeux brun.**

**Abréviations** : AGL : acide gras libre ; AMPC : adénosine monophosphate cyclique ; LHS : lipase hormonosensible ; NE : norépinephrine ; PKA : protéine kinase A ;  $R\beta 3A$  : récepteur  $\beta 3$  adrénergique ; TG : triglycérides ; UCP1 : *uncoupling protein 1*.

Le volume et l'activité du TAB sont modulés par différents facteurs. Chez l'Homme, il est plus difficile de détecter l'activité du TAB par TEP chez les adultes et les personnes âgées (Cypess et al., 2009; Rogers, 2014). Le pourcentage de détection diminue également lorsque le poids de l'individu est élevé (Pfannenbergl et al., 2010; van Marken Lichtenbelt et al., 2009), et lorsque ce dernier est diabétique (Ouellet et al., 2011). À l'inverse, les femmes présentent un TAB plus actif et plus volumineux que les hommes (Cypess et al., 2009; Ouellet et al., 2011; Pfannenbergl et al., 2010).

### **3.4 Stimulation de la thermogenèse : cible thérapeutique pour les maladies métaboliques**

La quantité de TAB est très hétérogène dans la population humaine. Certaines études distinguent d'ailleurs les sujets « TAB positifs » et « TAB négatifs » (Nedergaard et al., 2010). Ainsi, plusieurs scientifiques sont critiques quant à la possibilité de stimuler efficacement ce tissu pour des applications thérapeutiques. Toutefois, de nombreuses études animales et humaines ont montré des effets bénéfiques dans le cadre de diabète ou d'obésité (Tableau 3) (Schrauwen and van Marken Lichtenbelt, 2016). En effet, le TAB consomme beaucoup d'énergie pour produire de la chaleur : il est estimé que 60 g de ce tissu chez l'adulte pourrait brûler à lui seul environ 4 kg de tissu adipeux en un an (Virtanen et al., 2009). Son activation est donc une cible intéressante pour rétablir le déséquilibre énergétique, mais aussi pour diminuer la résistance à l'insuline (de Souza and Burkey, 2001; Orava et al., 2011; Roberts-Toler et al., 2015). Différentes méthodes permettent de stimuler l'activité de thermogenèse du TAB : les deux principales sont les expositions au froid et l'administration d'agonistes des R $\beta$ 3A.

#### **3.4.1 Les expositions au froid**

Lorsque la température ambiante diminue, la thermogenèse avec frissons, effectuée par contraction rapide des muscles squelettiques, s'active (Silva, 2006). Celle-ci intervient au début du processus de thermogenèse adaptative en réponse à une exposition au froid, puis la thermogenèse sans frissons effectuée par le TAB prend peu à peu le relais (Cannon and Nedergaard, 2010; Cypess et al., 2012; S. Lim et al., 2012). La captation du glucose par le TAB est grandement augmentée et la perfusion sanguine de ce tissu est doublée en condition de froid afin de dissiper la chaleur produite à travers le corps (Orava et al., 2011).

L'humain vivant majoritairement dans des conditions de thermoneutralité, par les vêtements et l'habitat, le TAB n'est que peu souvent mis à contribution, même dans les pays nordiques. Néanmoins, une première étude en 1981 sur 11 individus a montré une plus importante quantité de TAB chez des sujets Finlandais travaillant à l'extérieur comparativement aux sujets contrôles (Huttunen et al., 1981). Depuis, plusieurs études ont montré que la température extérieure influence l'activité et donc la détection du TAB par imagerie chez l'humain (Hanssen et al., 2015a; Ouellet et al., 2011; van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Il est estimé que la détection du TAB chez l'adulte en dessous de 40 ans pourrait atteindre les 100% si le TEP était effectué après stimulation par une exposition à une basse température (Leitner et al., 2017; Orava et al., 2011; Rogers, 2014; Virtanen et al., 2009). De récentes études ont montré que les expositions au froid permettaient d'augmenter la

dépense énergétique et le métabolisme du glucose chez l'individu obèse ou sain (Tableau 3) (Hanssen et al., 2015a; Virtanen et al., 2009). Une étude a même démontré que l'acclimatation au froid permettait d'augmenter la sensibilité à l'insuline de près de 40% chez des sujets atteints de DT2 en augmentant la translocation du transporteur GLUT4 au niveau du muscle (Hanssen et al., 2015b).

Des études animales ont montré que les expositions au froid, mais aussi la stimulation chronique des R $\beta$ 3A (voir section suivante), permettaient non seulement d'augmenter la capacité de thermogenèse des animaux ainsi que de corriger les désordres métaboliques (Tableau 3), mais aussi d'augmenter le nombre d'adipocytes bruns actifs. En effet, le TAB est composé de plusieurs cellules progénitrices, prêtes à se différencier en adipocyte brun. Leur différenciation est activée par la stimulation adrénérgique lors d'une diminution de température (Bronnikov et al., 1999; Cannon and Nedergaard, 2004; D. Richard et al., 2010). Ainsi, des expositions répétées à une basse température permettent de stimuler le TAB de manière régulière et d'augmenter son volume et son activité, de façon assez similaire au muscle lors d'un entraînement physique répété (Labbé et al., 2015a; Ravussin et al., 2014). Deux méthodes permettent de stimuler chroniquement la thermogenèse par le froid : des expositions courtes répétées au froid (4°C ou 10°C pour les rongeurs ; 15-16°C pour l'Homme) ou bien une diminution progressive de la température ambiante (diminution d'un degré par jour jusqu'à 10 ou 4°C) (Tableau 3).

Les expositions au froid vont donc avoir un effet global sur la stimulation de la thermogenèse adaptative du corps. De récentes études ont d'ailleurs montré que le muscle était également capable d'effectuer la thermogenèse sans frissons en réponse à une exposition au froid grâce à la présence d'une protéine découplante similaire à UCP1 : la sarcolipin (Bal et al., 2012; Pant et al., 2015; Rowland et al., 2015).

### 3.4.2 Les agonistes des récepteurs $\beta$ 3 adrénérgiques

Le système central de contrôle de la thermorégulation peut être court-circuité en allant stimuler directement les R $\beta$ 3A des adipocytes bruns. Les R $\beta$ 3A étaient considérés comme atypiques par rapport aux récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 dans les années 80. Le premier à avoir cloné le R $\beta$ 3A humain est le Dr Laurent Emorine (Emorine et al., 1989). Il étudia ses caractéristiques pharmacologiques et le compara aux récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2. Ce récepteur est une protéine de 408 acides aminés composée de 7 domaines transmembranaires (Figure 12) (Ursino et al., 2009). Il fait partie de la famille des récepteurs couplés à la protéine G, comme les  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2. Les R $\beta$ 3A de rat et d'humain ont 79% d'homologie, mais les domaines transmembranaires, responsables de la liaison au ligand, sont identiques à 94% (Ursino et al., 2009).

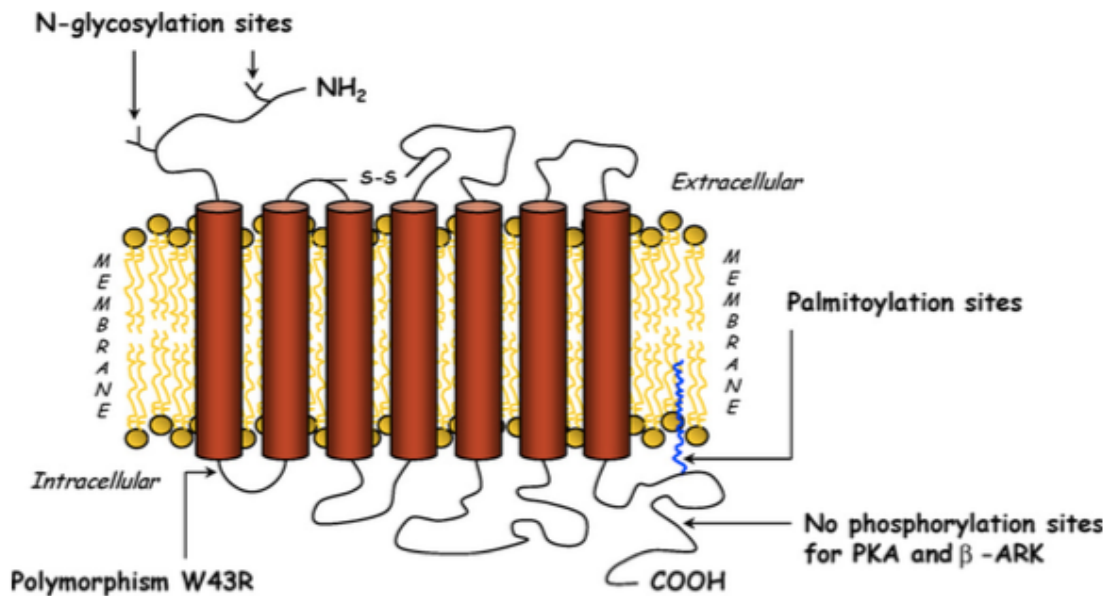


Figure 12. Représentation schématique du récepteur  $\beta_3$  adrénérgique.

Extrait de (Ursino et al., 2009).

Ce récepteur est exprimé principalement par les adipocytes bruns, mais également dans la vessie, le système digestif et dans le cerveau (cortex, l'hippocampe, hypothalamus et tronc cérébral) (B. A. Evans et al., 1996; Summers et al., 1995). Toutefois, son rôle physiologique dans le SNC est assez peu connu. Une étude a montré que la stimulation des  $R\beta_3A$  cérébraux par l'administration intracérébroventriculaire d'un agoniste reproduisait les effets métaboliques d'une administration périphérique (J. E. Richard et al., 2017). De plus, certains agonistes des  $R\beta_3A$  possèdent des effets antidépresseurs en augmentant la quantité de tryptophane au cerveau ainsi que la synthèse de la sérotonine (Claustre et al., 2008; Consoli et al., 2007). C'est ainsi que l'agoniste SR58611A (Amibegron®) a été testé en clinique jusqu'en phase 3 pour la dépression, mais n'a finalement pas été commercialisé (NCT00252330).

Pour étudier les  $R\beta_3A$ , plusieurs molécules ont été développées dans les années 80 dans le but de mimer les effets de la norépinephrine sur les  $R\beta_3A$  (Tableau 2). Ils sont chacun plus ou moins sélectifs des  $\beta_3$  par rapport aux  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , situés quant à eux au niveau du cœur, des muscles lisses vasculaires et bronchiques principalement. Pour plusieurs compagnies pharmaceutiques, l'objectif est donc de développer un agoniste le plus sélectif possible des  $\beta_3$  chez l'humain afin de stimuler spécifiquement le TAB sans effets secondaires (tels que l'hypertension) comme traitement pour le diabète et l'obésité. Dans les études précliniques, le plus couramment utilisé aujourd'hui est le CL-316,243 (Tableau 3) (J. D. Bloom et al., 1992). Il est très spécifique

pour les R $\beta$ 3A par rapport aux autres récepteurs adrénergiques ( $\beta$ 1 :  $\beta$ 2 :  $\beta$ 3 = 0 : 1 : 100 000) (Yoshida et al., 1994). De nombreuses études animales ont montré ses effets bénéfiques pour augmenter la dépense énergétique, améliorer la tolérance au glucose et diminuer la résistance à l'insuline dans différents modèles animaux de diabète et d'obésité (plusieurs sont référencées dans le Tableau 3). Cette molécule a également été testée chez l'humain sur 14 hommes sains (Weyer et al., 1998). Cette étude a montré une augmentation de la sensibilité à l'insuline après 4 semaines de traitement (1500 mg/jour) sans effets secondaires. En revanche, après 8 semaines, les effets étaient nettement diminués, et accompagnés d'une réduction inattendue des concentrations plasmatiques de la molécule.

Agoniste	Formule empirique	Poids moléculaire (Da)	EC50 pour $\beta$ 3 (nM)	Affinité de liaison $\beta$ 3/ $\beta$ 2/ $\beta$ 1 (Ki, nM)	½ vie
Norepinephrine	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	169	74	4300 / 26400 / 3570	2,5 minutes
Isoproterenol	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	247	13	1570 / 458 / 224	2 minutes
BRL-37344	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> ClNa	386	6	287 / 1750 / 1120	2 heures
CL-316,243	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> CINNa <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	465	3	3 / 30 000 / 100 000	16 heures
YM-178 (mirabegron)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	396	22	40 / 1300 / 4200	50 heures

**Tableau 2. Différents agonistes des récepteurs  $\beta$ 3 adrénergiques.**

Informations extraites de (Atgié et al., 1997; Hoffmann et al., 2004; Simard et al., 1994; Tanaka et al., 2003; Weyer et al., 1998).

Le seul agoniste des R $\beta$ 3A qui ait passé les différentes phases d'essai clinique pour le moment est le mirabegron (Myrbetriq®), qui est indiqué pour le traitement de la vessie hyperactive à une dose de 50 mg (Chapple et al., 2014b; Chapple and Siddiqui, 2017; Shin et al., 2019; Yamaguchi et al., 2018). Toutefois, cet agoniste semble avoir d'autres applications intéressantes. En effet, l'équipe du Dr Aaron M. Cypess, qui a mis en évidence la présence de TAB actif chez l'adulte, a récemment montré qu'une seule dose de 200 mg de mirabegron permettait de stimuler ce tissu chez l'adulte (Cypess et al., 2015). En revanche, cette dose quatre fois supérieure à la dose utilisée en clinique induit des effets cardiovasculaires indésirables. Une récente étude sur 17 volontaires a investigué les effets cardiovasculaires de doses de 50 à 200 mg de mirabegron (Loh et al., 2018). La dose de 100 mg était efficace pour augmenter la dépense énergétique et la température supraclaviculaire (indiquant une activité de thermogenèse du TAB) sans effets secondaires cardiovasculaires.

Une autre étude sur 12 individus a montré des effets métaboliques pour la dose de 200 mg mais pas de la dose de 50 mg (Baskin et al., 2018). Toutefois, d'autres études cliniques sont nécessaires pour confirmer ces effets sur une plus grande population et sur des sujets atteints de maladies métaboliques.

Traitement	Modèle	Observations	Référence
<b>Rongeur</b>			
CL-316,243 (1 mg/kg/jour, 17 jours)	Souris femelles	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ dépense énergétique</li> <li>↑ prise alimentaire</li> <li>↑ production d'insuline</li> <li>= poids, ↓ masse adipeuse</li> </ul>	Garilova 2000
Acclimatation au froid (4°C, 4 h, 3 fois / semaine, 10 semaines)	Souris C57BL/6J, diète riche en gras	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activation TAB</li> <li>↑ dépense énergétique</li> <li>↑ prise alimentaire</li> <li>↑ = tolérance au glucose</li> <li>= poids</li> </ul>	Ravussin 2014
CL-316,243 (1 mg/kg/jour, 4 semaines)	Souris C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activation TAB</li> <li>↑ dépense énergétique</li> <li>↑ prise alimentaire</li> <li>↑ tolérance au glucose</li> <li>= poids</li> </ul>	Xiao 2015
Acclimatation au froid (10°C, 21 jours)	Rats Wistar	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activation TAB</li> <li>↑ dépense énergétique</li> <li>↑ métabolisme du glucose</li> <li>↑ métabolisme des lipides</li> </ul>	Labbé 2015
CL-316,243 (1 mg/kg/j, 14 jours)	Rats Wistar et Lou/C	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activation TAB</li> <li>= poids, ↓ masse adipeuse</li> <li>↑ métabolisme du glucose</li> <li>↑ métabolisme des lipides</li> <li>↓ hyperinsulinémie</li> </ul>	Poher 2015
Mirabegron (0,1 mg/kg, aigüe)	Souris C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activation TAB</li> </ul>	Roberts-Toler 2015
CL-316,243 (1 mg/kg/jour, 3 semaines)	Souris diabétiques (MKR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ métabolisme du glucose</li> <li>↑ métabolisme des lipides</li> <li>= poids, ↓ masse adipeuse</li> <li>↓ hyperinsulinémie</li> </ul>	Kumar 2015
CL-316,243 (1 mg/kg/j, 14 jours)	Souris C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ = activation TAB</li> <li>= prise alimentaire</li> <li>= poids, ↓ masse adipeuse</li> </ul>	Labbé 2016
Acclimatation au froid (10°C, 14 jours)	Souris C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activation TAB</li> <li>↑ prise alimentaire</li> <li>= poids, ↓ masse adipeuse</li> </ul>	Labbé 2016
CL-316,243 (10 ug, ICV)	Rats Sprage- Dawley	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ prise alimentaire</li> <li>↓ poids</li> <li>↑ libération d'insuline</li> </ul>	Richard 2017

Humain			
Exposition au froid (16°C, 2 h)	24 hommes sains ou obèses	↑ activation TAB ↑ dépense énergétique	van Marken Lichtenbelt 2009
Exposition au froid (17-19°C, 2 h)	5 sujets sains	↑ activation TAB Détection d'UCP1 dans TAB	Virtanen 2009
Exposition au froid (17-19°C, 2 h)	27 sujets sains	↑ activation TAB ↑ dépense énergétique Détection d'UCP1 dans le TAB	Orava 2011
Exposition au froid (18°C (combinaison conditionnée par liquide), 2h)	6 sujets sains	↑ dépense énergétique ↓ température de la peau = thermogenèse avec frisson	Ouellet 2012
Acclimatation au froid (15°C, 2 à 6 h / jour, 10 jours)	17 sujets sains (9 femmes, 8 hommes)	↑ activation TAB ↑ dépense énergétique ↓ température de la peau	van der Lans 2013
Exposition au froid (T° limite pour frissonnement, 3-8 h)	12 hommes sains	↑ dépense énergétique ↓ température de la peau ↑ sensibilité à l'insuline	Chondronikola 2014
Acclimatation au froid (15°C, 6 h / jour, 10 jours)	8 sujets diabétiques	↑ activation TAB ↑ dépense énergétique ↑ sensibilité à l'insuline ↑ GLUT4 dans le muscle	Hanssen 2015 (Nat Med)
Acclimatation au froid (15°C, 6 h / jour, 10 jours)	10 sujets obèses	↑ activation TAB ↑ dépense énergétique ↓ température de la peau ↑ GLUT4 dans le muscle ↑ pression artérielle	Hanssen 2015 (Diabetes)
Mirabegron, 200 mg	12 hommes sains	↑ activation TAB ↑ dépense énergétique ↑ pression artérielle*	Cypess 2015
Acclimatation au froid (10°C (combinaison), 2 h / jour, 5 fois par semaine, 4 semaines)	9 hommes sains	↑ dépense énergétique ↓ température de la peau ↓ thermogenèse avec frisson	Blondin 2017

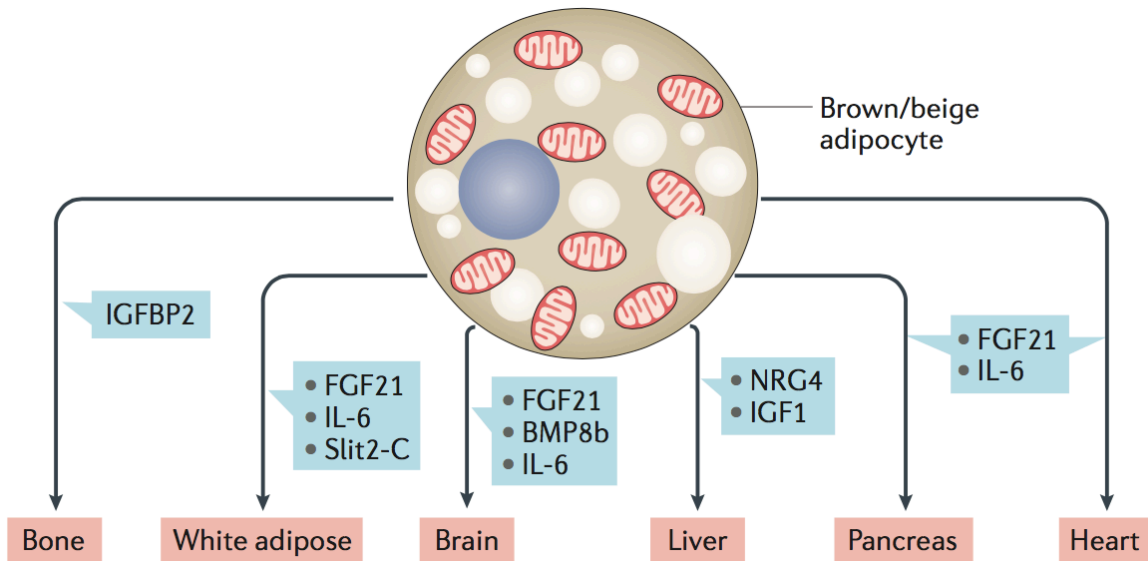
**Tableau 3. Effet de la stimulation de la thermogenèse sur les désordres métaboliques dans des modèles animaux et chez l'Homme.**

\*Effet secondaire détecté. **Abréviations** : GLUT4 : transporteur du glucose 4; ICV : intracérébroventriculaire; TAB : tissu adipeux brun; UCP1 : uncoupling protein 1.



### 3.4.3 Le tissu adipeux brun : un organe endocrinien

Ces dernières années, le rôle du TAB s'est largement développé par la découverte de la fonction endocrine de ce tissu (Villarroya et al., 2017). Non seulement le TAB est capable de consommer du glucose et des lipides pour produire de la chaleur, mais il serait également capable de communiquer avec les différents organes, dont le cerveau, en sécrétant des molécules de signalisation appelées des « batokines » (par analogies aux adipokines, molécules sécrétées par le tissu adipeux blanc).



**Figure 13. Les différentes « batokines » sécrétées par le tissu adipeux brun et leurs organes cibles.**

Extrait de (Villarroya et al., 2017). **Abréviations** : *BMP8b* : bone morphogenetic protein 8b; *FGF21* : fibroblast growth factor 21; *IGF1* : insulin-like growth factor 1; *IGFBP2* : insulin-like growth factor binding protein 2; *IL-6* : interleukine 6 ; *Slit2-C* : Slit homolog 2, C fragment.

Le TAB est notamment capable de sécréter le facteur de croissance des fibroblastes 21 (FGF21) lorsqu'il est stimulé par le froid (Hondares et al., 2011). FGF21 est une hormone qui joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme, notamment en exerçant une action hypoglycémiant (Bookout et al., 2013; Ni et al., 2015). Les sujets diabétiques peuvent développer une résistance à FGF21, de manière similaire à l'insuline (Benomar et al., 2016; Markan et al., 2017). D'ailleurs, de nombreuses études ont montré que l'administration de FGF21 ou de ses analogues permettait de corriger les désordres métaboliques dans des modèles animaux de diabète (Andersen et al., 2015; Kim et al., 2015; Sarruf et al., 2010; Schlein et al., 2016). Ainsi, l'idée d'utiliser cette hormone comme un normoglycémiant dans le cadre du DT2 pour remplacer l'insuline a été

investiguée, mais l'effet n'était pas considéré suffisant chez le primate par rapport aux autres médicaments pour poursuivre les études cliniques (Kharitononkov and Adams, 2014).

De façon intéressante, une récente étude cellulaire suggère que FGF21 pourrait avoir un rôle neuroprotecteur contre l'excitotoxicité glutamatergique et la toxicité d'A $\beta$  (Amiri et al., 2018; Sa-Nguanmoo et al., 2016a). Au niveau animal, FGF21 permet de renverser les déficits cognitifs induits par une diète riche en gras saturés chez la souris et le rat (Sa-Nguanmoo et al., 2016b; Q. Wang et al., 2018) et de réduire les lésions de la BHE (Kuroda et al., 2017; Yu et al., 2018).

## **4 Thermorégulation et maladie d'Alzheimer**

Il est bien connu que des déficits métaboliques sont observés dans la MA et sont liés au développement de la pathologie comme discuté plus haut. En revanche, peu d'études ont investigué le lien entre thermorégulation et MA. Pourtant, le déficit de thermorégulation chez les personnes âgées est décrit depuis longtemps, la plupart des études sur le sujet étant relativement anciennes. Mais surtout, il existe maintenant une littérature scientifique conséquente sur le fait que la température corporelle influence les marqueurs neuropathologiques de la MA. Ces différents aspects seront présentés dans cette section.

### **4.1 Déficiences de thermorégulation chez les personnes âgées**

Le phénomène de vieillissement amène avec lui plusieurs changements conséquents pour le fonctionnement général du corps. Tout d'abord, avec l'âge, le métabolisme énergétique central et périphérique diminue peu à peu (Frisard et al., 2007; Rizzo et al., 2005). Ce qui est également frappant est que les personnes âgées présentent un déficit de thermorégulation : il se caractérise par une difficulté à ressentir les changements thermiques et à évaluer la température ambiante (Florez-Duquet and McDonald, 1998; Van Someren et al., 2002). Il a également été rapporté que le cycle circadien était perturbé chez les personnes âgées (Weinert, 2000), et qu'il l'était d'autant plus chez les personnes atteintes de démence (Weldemichael and Grossberg, 2010). De façon plus marquée, le retour à la normale de la température corporelle suite à une exposition au froid se fait de manière plus lente avec l'âge (Degroot and Kenney, 2007) : les personnes âgées mettent en moyenne 30% plus de temps pour retrouver leur température orale initiale après ingestion d'eau glacée (Sugarek, 1986).

Ces déficits pourraient être en partie expliqués par le fait que ces individus auraient de plus importantes pertes de température corporelle car leur vasoconstriction, permettant de limiter la diffusion de la température à travers la peau lors d'une exposition au froid, serait moins efficace que les personnes plus jeunes (Florez-Duquet and McDonald, 1998; Richardson et al., 1992). D'autre part, l'activité du système nerveux sympathique de la peau en réponse aux variations de la température est diminuée dans cette population : ils auraient donc plus de difficulté à ressentir les changements de température ambiante (Grassi et al., 2003). Mais surtout, avec l'âge, l'activité et le volume du TAB diminuent grandement (Cypess et al., 2009; Graja and Schulz, 2015).

Les déficits de thermorégulation des personnes âgées limitent leur capacité à réajuster leur température corporelle à un niveau optimal et pourrait donc expliquer pourquoi les personnes âgées présentent une diminution de leur température corporelle. En effet, quelques études ont rapporté que la température corporelle moyenne des personnes âgées était plus basse que les personnes plus jeunes (Hoshino et al., 2007; Howell, 1975). Une étude sur 100 participants âgés de plus de 65 ans vivant dans le même environnement a montré que dans plus de 90% des cas, leur température orale en début, milieu et fin de journée se trouvait sous les 37°C (Gomolin et al., 2005). Une autre étude sur plus de 400 sujets âgés de 15 à 84 ans a montré que la température axillaire des sujets de plus de 55 ans était plus basse que celle des groupes plus jeunes (Hoshino et al., 2007). D'ailleurs, cette population âgée est plus à risque d'hypothermie : selon une étude effectuée en Grande-Bretagne, environ 9% des personnes âgées ont une température corporelle un demi degré sous 35°C, limite clinique de l'hypothermie (Fox et al., 1973). En revanche, une étude sur 93 sujets âgés de 62 à 96 ans n'a pas mis en évidence de corrélation négative entre l'âge et la température corporelle (Marion et al., 1991).

Il faut noter que ces études présentent des biais de méthode. En effet, la plupart se basent sur des mesures de température orale, qui peut être influencée par ce que la personne vient de manger ou boire, et n'est qu'assez peu corrélée à la température interne (Sund-Levander and Grodzinsky, 2013). Les personnes âgées ayant fréquemment une température moyenne plus basse que 37°C, comme mentionnée plus haut, la fièvre devrait être vérifiée en clinique avec d'autres variables comme la présence de la protéine C réactive dans le sang par exemple et non pas seulement à l'aide d'une prise de la température corporelle (Hoshino et al., 2007). De plus, la température est souvent prise à un seul moment de la journée (le matin). Comme la température suit un rythme circadien, suivre la température corporelle en continue tout au long des 24 heures apporterait beaucoup plus d'informations quant à la fluctuation de la température corporelle chez les personnes âgées. Pour réellement comprendre le déficit de thermorégulation des personnes âgées, il faudrait réaliser des études longitudinales avec des mesures de la température en continue et en ambulatoire. Ceci peut être réalisé par exemple avec des sondes de télémétrie, sur une période de plusieurs jours et dans un environnement contrôlé du mieux que possible, idéalement sur une population de personnes âgées hébergées dans le même établissement de santé.

## 4.2 Déficiets de thermorégulation dans la maladie d'Alzheimer

L'âge étant le principal facteur de risque de la MA, les perturbations de thermorégulation ont également été observées dans la population atteinte de la MA. En effet, plusieurs études rapportent un cycle circadien perturbé chez les sujets atteints de démence, ainsi qu'une plus grande amplitude de variation de la température corporelle (Harper et al., 2004; Satlin et al., 1995; Weldemichael and Grossberg, 2010). Le rythme circadien de la pression artérielle est également perturbé chez les sujets Alzheimer comparativement aux sujets sains (Chen et al., 2013). De plus, une étude sur 237 sujets âgés de plus de 65 ans a montré que le statut de démence influençait la température rectale et tympanique prise le matin (Sund-Levander and Wahren, 2002). Toutefois, il n'y a pas vraiment de consensus sur l'effet de la MA sur la température corporelle moyenne : certaines études rapportent une diminution de la température corporelle chez les sujets atteints de la MA, tandis que d'autres présentent l'inverse ou aucun changement ("Body temperature as a risk factor for Alzheimer's disease," 2000; Harper et al., 2001; Klegeris et al., 2007; Prinz et al., 1992; Touitou et al., 1986; Volicer et al., 2001). Cette inconsistance des résultats dépend de nouveau de la méthode et du moment de la prise de température, mais également du stade de la MA et des symptômes neuropsychologiques associés (Okawa et al., 1991). En effet, certains patients présentent une grande agitation et des troubles comportementaux pouvant influencer leur locomotion. D'autre part, les troubles du sommeil sont fréquents dans cette population et peuvent affecter le rythme circadien (Klaffke and Staedt, 2006; Lushington et al., 2000; Most et al., 2012).

Récemment, une étude a analysé les résultats de trois grandes études observationnelles, regroupant les données de plus de 3000 sujets et a montré une variation des scores cognitifs, du diagnostic clinique et de la quantité d'A $\beta$ 42 dans le LCR en fonction des saisons de l'année (A. S. P. Lim et al., 2018). Plus précisément, les auteurs ont observé que pendant les saisons plus froides de l'année (printemps et hiver), les scores cognitifs étaient moins bons, il y avait un plus grand nombre de diagnostic de MA et une plus basse quantité d'A $\beta$ 42 dans le LCR que durant l'été et l'automne. Bien qu'une étude longitudinale de grande échelle soit nécessaire pour confirmer ces résultats, ceci suggère que la MA pourrait être influencée par les saisons et la température extérieure.

Quelques études animales ont mis en évidence un déficit de thermorégulation dans des modèles murins de la MA. La souris 3xTg-AD présente des troubles dans le rythme circadien avant même que la neuropathologie soit significativement détectée dans leur cerveau (Sterniczuk et al., 2010). Ceci est caractérisé notamment par une température moyenne plus élevée que les souris contrôles à 6 et 10 mois d'âge, accompagnée d'une augmentation de l'activité locomotrice de ces animaux (Knight et al., 2013). Un autre modèle animal de

pathologie amyloïde présente une diminution de la température corporelle de façon âge-dépendant, par rapport aux animaux contrôles, à l'âge de 20 mois (Huitrón-Reséndiz et al., 2002). De façon intéressante, un groupe a montré que le poids du TAB était diminué dans la souris 3xTg-AD (García-Mesa et al., 2012). Plus récemment, notre équipe a montré que la 3xTg-AD présentait une diminution de la température corporelle avec l'âge et l'avancée de la neuropathologie : la différence était significative à partir de l'âge de 12 mois, âge où la neuropathologie est bien installée dans le cerveau des animaux (Vandal et al., 2016). Ces études suggèrent que le développement de la neuropathologie Alzheimer affecte les processus de régulation de la température corporelle. À l'inverse, les mécanismes impliqués dans la thermorégulation peuvent moduler la MA comme le décrit la section suivante.

### **4.3 Thermorégulation et maladie d'Alzheimer : arguments issus d'études animales**

Le lien entre diminution de température corporelle et phosphorylation de la protéine tau a été mis en évidence par plusieurs travaux. En effet, des études sur des modèles animaux (rats et souris) montrent que l'hypothermie, induite par une anesthésie ou un jeûne prolongé, conduit à une augmentation de l'hyperphosphorylation de la protéine tau dans le cerveau (Planel et al., 2004; 2007). Selon ces études, l'hyperphosphorylation est non seulement associée à l'augmentation de l'activité de plusieurs kinases, mais aussi et surtout à l'inhibition de l'activité de la protéine phosphatase 2A (PP2A). Cette augmentation de la phosphorylation est très rapide et drastique : il est estimé que pour une diminution de 1°C de température corporelle, la phosphorylation de la protéine tau est augmentée de 80% (Planel et al., 2007).

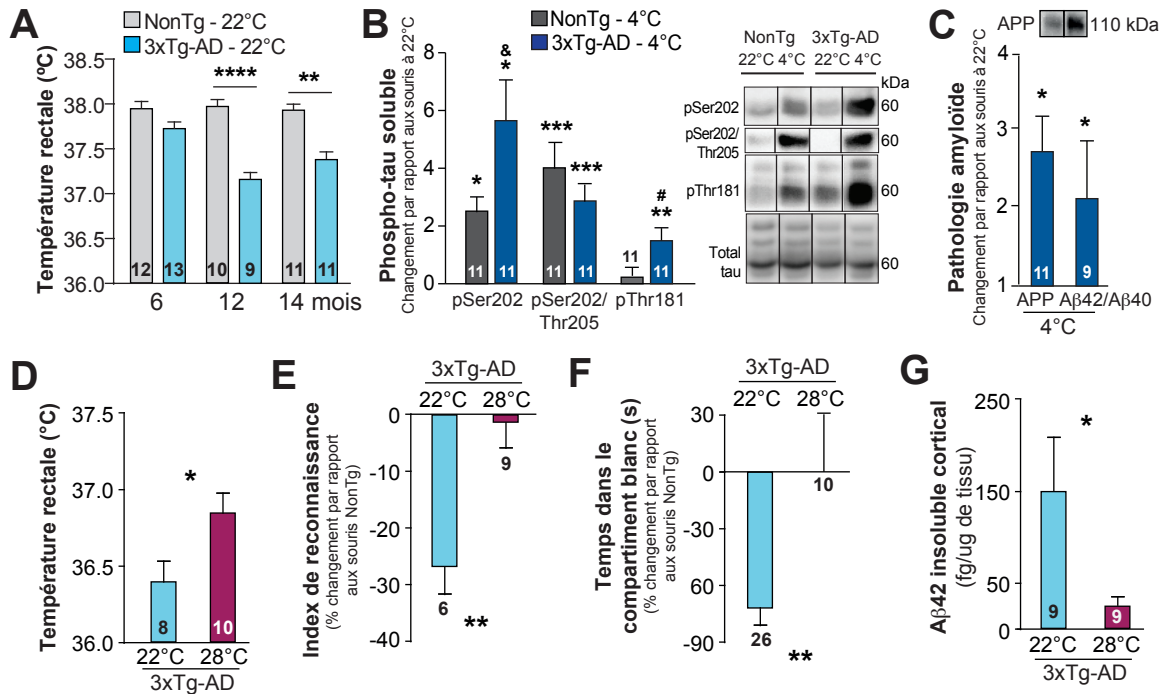
Plus récemment, deux études ont montré que la hausse de phosphorylation de la protéine tau dans deux modèles animaux de diabète (les souris db/db et ob/ob) était induite par l'hypothermie, apparaissant de façon âge-dépendant dans ces souris (El-Khoury et al., 2016; Gratuze et al., 2017a). En effet, le retour à la normothermie de ces souris par une exposition à une température de 34°C pendant une heure permet de réduire l'hyperphosphorylation sur la plupart des sites de la protéine tau. L'hypothermie et les déficits de thermorégulation étant également fréquents dans la population diabétique (B. W. Foster, 1869; Neil et al., 1986; Scott et al., 1987), ces études proposent une explication originale au fait que les individus diabétiques ont plus de risque de développer la MA.

De façon intéressante, cette augmentation de l'hyperphosphorylation de la protéine tau a également été observée dans le cerveau d'animaux qui hibernent (Arendt et al., 2003; Stieler et al., 2011), et donc diminuent

drastiquement leur métabolisme et leur température corporelle pendant un certain temps. Une étude chez l'écureuil terrestre de l'arctique a montré que différents sites de phosphorylation de la protéine tau sont impliqués, tandis que la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) est d'avantage présente sous sa forme inactive (Stieler et al., 2011). Toutefois, dans ces modèles d'hibernation, l'hyperphosphorylation de la protéine tau n'est que transitoire et revient à la normale dès la sortie de la torpeur (Arendt and Bullmann, 2013). Ce mécanisme semble plutôt être un phénomène neuroprotecteur en réponse à ce changement physiologique dans ce cas-ci.

En revanche, il est possible qu'un tel retour à la normal ne soit pas retrouvé chez les personnes âgées. En effet, les cas de troubles cognitifs et délirium post-opératoire suggèrent que l'anesthésie peut avoir des répercussions à long terme sur les aînés (Ancelin et al., 2001; Fodale et al., 2010; Papon et al., 2011). En ce sens, plusieurs études animales ont montré que l'anesthésie augmentait la phosphorylation de la protéine tau (Planel et al., 2009; 2008; Tan et al., 2010). En effet, l'anesthésie affecte la régulation de la température corporelle : l'hypothermie induite par l'anesthésie serait donc responsable de ses effets délétères dans le cerveau (Lenhardt, 2010). Certains ont montré que le maintien de la température corporelle des animaux sous anesthésie permettait de maintenir des niveaux de phosphorylation de tau normaux et de contrer les effets néfastes de l'anesthésie (Planel et al., 2007). En revanche, d'autres ont observé que même en condition de normothermie, l'exposition à l'anesthésie augmentait la phosphorylation de la protéine tau (Le Freche et al., 2012). De manière intéressante, bien que les effets d'une seule exposition d'une heure soient transitoires, l'exposition répétée à l'anesthésie induit une hyperphosphorylation persistante à long terme chez la souris. De plus, quelques études proposent que les anesthésiants aient un effet direct sur l'activité des kinases impliquées dans la phosphorylation de tau (Run et al., 2010).

Finalement, nous avons récemment montré un déficit de thermorégulation chez la souris 3xTg-AD survenant à partir de l'âge de 12 mois (Figure 14A) (Vandal et al., 2016). De façon surprenante, une seule exposition aigüe au froid de 24 heures à 4°C augmente la phosphorylation de tau de façon plus importante chez les souris 3xTg-AD comparativement aux souris non-transgéniques. De plus, l'exposition au froid augmente de deux fois le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et la quantité d'APP dans le cortex des souris 3xTg-AD de 12 mois (Figure 14B,C). À l'inverse, augmenter leur température corporelle de 0,5°C en les exposant à un environnement thermoneutre (28°C) pendant une semaine diminue le déficit cognitif, l'anxiété et la pathologie amyloïde de souris 3xTg-AD de 20 mois (Figure 14D-G) (Vandal et al., 2016). Ces résultats montrent pour la première fois que les changements de température externe, recrutant ainsi les mécanismes de thermorégulation de l'animal, affectent à la fois le comportement et la neuropathologie Alzheimer dans un modèle murin de la MA.



**Figure 14. Effets d'expositions au froid et à thermoneutralité chez la souris 3xTg-AD.**

(A) La souris 3xTg-AD développe spontanément une baisse de la température corporelle avec l'âge. Une exposition au froid (4°C) de 24 heures augmente (B) la phosphorylation de tau dans le cortex de souris 3xTg-AD et NonTg de 12 mois et (C) les niveaux d'APP et le ratio Aβ42/Aβ40 dans le cortex de souris 3xTg-AD de 12 mois. Une semaine d'exposition à une température thermoneutre (28°C) augmente (D) la température corporelle, (E) améliore la mémoire de reconnaissance, (F) diminue l'anxiété et (G) la quantité de peptides Aβ42 insolubles dans le cortex de souris 3xTg-AD de 20 mois. Adapté de (Vandal et al., 2016).

**Abbréviations :** NonTg: souris non-transgéniques; 3xTg-AD: souris triple transgéniques; APP : protéine précurseur de l'amyloïde.



# Hypothèses et objectifs

## 1 Hypothèses

La majorité des études précliniques et cliniques sur la MA s'est concentrée sur la diminution des pathologies amyloïdes et tau. Toutefois, les dogmes proposant que la cascade amyloïde et la pathologie tau sont les causes du développement de la MA ont été bousculés au cours de ces dernières années. Un retour en arrière vers l'étude des potentielles causes de la maladie est nécessaire afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour la MA.

Puisque que l'âge avancé est extrêmement important pour le déclenchement de la maladie, mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés au vieillissement pourrait nous permettre d'élucider certains aspects de la pathogenèse de la MA. Bien que peu d'études soient disponibles sur le lien entre thermorégulation et MA, des études animales ont permis d'établir clairement le lien entre diminution de température corporelle et hyperphosphorylation de la protéine tau dans le cerveau. D'autre part, le déficit de thermorégulation survenant chez les personnes âgées est également bien documenté. Ainsi, le fait que les personnes âgées aient plus de difficulté à réguler leur température corporelle pourrait expliquer pourquoi elles sont plus à risque de développer la MA.

Intervenir sur la thermorégulation pourrait être une stratégie doublement intéressante : les désordres métaboliques contribuent à la pathogenèse de la MA, et le déficit de thermorégulation, du moins dans les modèles animaux, accentue la neuropathologie Alzheimer. La stimulation de la thermogenèse ayant fait ses preuves comme outil thérapeutique pour les maladies métaboliques, stimuler la thermorégulation pourrait être bénéfique pour la MA en corrigeant à la fois les désordres métaboliques et les déficits de thermorégulation.

Notre hypothèse générale est que le déficit de thermorégulation des personnes âgées contribue au développement de la MA et que le corriger permettrait de réduire à la fois les désordres métaboliques, la neuropathologie et les déficits cognitifs associés à la MA. De plus, étudier le lien entre thermorégulation et MA nous permettrait peut-être de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la MA.

Comme discuté dans la fin de l'introduction, notre équipe a montré que la pathologie Alzheimer induite génétiquement dans un modèle animal de la MA (la souris 3xTg-AD) aggrave l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite par une exposition au froid. Mais qu'en est-il du facteur de l'âge, qui est le principal facteur

de risque de la MA ? Quels seraient les effets d'une intervention visant à améliorer les mécanismes de thermorégulation, plus précisément la thermogenèse du TAB, sur la pathologie Alzheimer ?

## **2 Objectifs**

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé la souris afin d'intervenir sur la thermorégulation et d'être capable d'analyser directement les effets sur le cerveau de ces mêmes animaux. Le choix d'utiliser la souris 3xTg-AD s'est basé sur nos précédentes études, montrant que ce modèle murin de la MA présente des désordres du métabolisme et de la thermorégulation associés à l'évolution des pathologies tau et amyloïde. Comme l'apparition des déficits cognitifs et de la neuropathologie est très progressive dans cet animal, nous avons sélectionné des animaux âgés, permettant de prendre en compte le vieillissement dans nos études. Finalement, ce modèle nous a permis d'évaluer l'effet de nos interventions sur les deux marqueurs neuropathologiques principaux de la MA.

L'objectif général de cette thèse est de déterminer si la thermorégulation pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la MA. Plus précisément, nous avons cherché à savoir si l'augmentation de l'activité de thermogenèse permettait de moduler la pathologie Alzheimer dans un modèle murin de la maladie.

### **2.1 Objectif spécifique 1**

Nous avons précédemment montré que la neuropathologie de la MA était un facteur aggravant l'hyperphosphorylation de tau en réponse à une exposition au froid. Notre premier objectif était de déterminer si l'âge était un facteur influençant le lien entre température corporelle et hyperphosphorylation de la protéine tau.

Nous avons comparé l'effet d'une exposition aiguë au froid (24 heures, 4°C) sur la phosphorylation de tau dans le cortex de souris jeunes (6 mois) et âgées (18 mois) non-transgéniques. Nous avons également vérifié

l'effet de cette exposition au froid sur la température et l'activité du TAB des animaux. Finalement, nous avons mesuré les différentes kinases et phosphatases impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau.

## **2.2 Objectif spécifique 2**

Par la suite, nous avons réalisé deux études dont le but était de déterminer l'effet de la stimulation de la thermogenèse du TAB sur la neuropathologie des souris 3xTg-AD. Pour cela, nous avons utilisé deux approches différentes.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des expositions répétées au froid, une méthode globale et non pharmacologique. Nous voulions déterminer si cette méthode d'acclimatation au froid permettait de protéger les souris 3xTg-AD âgées des effets délétères d'une exposition aiguë au froid.

Nous avons exposé des souris 3xTg-AD âgées de 15 mois à de courtes expositions au froid de façon répétée (4 heures à 4°C, 5 fois par semaine) pour une durée totale d'un mois, avant de les présenter à une exposition aiguë au froid (24 heures à 4°C). Nous avons comparé ce groupe à un groupe de souris contrôles restées à la température d'hébergement (22°C) tout au long de l'expérience, et à un groupe de souris ayant reçu une seule exposition aiguë au froid (24 heures à 4°C). Nous avons déterminé l'effet de l'intervention sur la capacité de thermogenèse et la tolérance au glucose des animaux. Nous avons également mesuré les niveaux de phosphorylation de la protéine tau et de peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD âgées. Finalement, nous avons évalué la production de FGF21 en réponse aux expositions au froid répétées ou aiguës.

## **2.3 Objectif spécifique 3**

Dans un second temps, nous avons utilisé une approche pharmacologique par l'administration chronique d'un agoniste des R $\beta$ 3A. Cette deuxième méthode vise directement les R $\beta$ 3A présents sur le TAB sans stimulation du système nerveux sympathique. Nous voulions savoir si l'activité de thermogenèse du TAB permettait de diminuer la neuropathologie et les déficits cognitifs des souris 3xTg-AD âgées, et si les agonistes des R $\beta$ 3A pouvaient être utilisés dans le traitement de la MA.

Nous avons administré le CL-316,243 à une dose de 1 mg/kg par jour ou du salin pour une durée d'un mois à des souris non-transgéniques et 3xTg-AD. Nous avons utilisé des souris âgées de 16 mois afin d'évaluer

l'effet du traitement à un âge avancé. Nous avons d'abord évalué l'effet de l'agoniste sur les paramètres métaboliques des animaux, puis sur la température corporelle et l'activité du TAB. Nous avons effectué plusieurs tests comportementaux afin de déterminer si le traitement avait des conséquences sur la locomotion, l'anxiété et la mémoire de reconnaissance des différents groupes de souris. Finalement, les pathologies tau et amyloïdes ont été quantifiées dans l'hippocampe des animaux.

**Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer.**

# **Old age potentiates cold-induced tau phosphorylation: linking thermoregulatory deficit with Alzheimer's disease**

Marine Tournissac<sup>1,2,3</sup>, Milène Vandal<sup>1,2,3</sup>, Arnaud François<sup>1,2</sup>, Emmanuel Planel<sup>4,2</sup>, Frédéric Calon<sup>\*1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada;

<sup>2</sup>Axe Neurosciences, Centre de recherche du centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Québec, Québec, Canada;

<sup>3</sup>Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Québec, Québec, Canada;

<sup>4</sup>Faculté de médecine, Département de psychiatrie et de neurosciences, Université Laval, Québec, Québec, Canada.

## 1.1. Résumé

Les déficits de thermorégulation coïncident avec le pic d'incidence de la maladie d'Alzheimer (MA) à un âge avancé. Une basse température corporelle augmente la phosphorylation de tau (pTau), un marqueur neuropathologique de la MA. Pour déterminer si l'âge avancé potentialise pTau induite par le froid, nous avons comparé l'effet d'une exposition au froid (4°C, 24h) sur des souris de 6 et 18 mois. La température corporelle, l'activité du tissu adipeux brun et pTau sur la Ser202 après l'exposition étaient similaires entre les souris jeunes et âgées. En revanche, seules les souris âgées avaient une augmentation de pTau sur les Thr181 et Thr231, corrélant avec leur température corporelle. L'inactivation de GSK3 $\beta$  chez les souris jeunes suggère un mécanisme protecteur contre pTau induite par le froid. Ces résultats suggèrent que l'âge avancé confère une plus grande susceptibilité à pTau suivant un changement de la température, contribuant à augmenter le risque de MA.

## 1.2. Abstract

Thermoregulatory deficits coincide with a rise in the incidence of Alzheimer's disease (AD) in old age. Lower body temperature increases tau phosphorylation, a neuropathological hallmark of AD. To determine whether old age potentiates cold-induced tau phosphorylation, we compared the effects of cold exposure (4°C, 24h) in 6- and 18-month-old mice. Cold-induced changes in body temperature, brown adipose tissue activity and phosphorylation of tau at Ser202 were not different between 6- and 18-month-old mice. However, following cold exposure, only old mice displayed a significant rise in soluble tau pThr181 and pThr231, which was correlated with body temperature. Inactivation of GSK3 $\beta$  was more prominent in young mice, suggesting a protective mechanism against cold-induced tau phosphorylation. These results suggest that old age confers higher susceptibility to tau hyperphosphorylation following a change in body temperature, thereby contributing to an enhanced risk of developing AD.

## 1.3. Introduction

Aging is by far the most important risk factor of Alzheimer's disease (AD) (Querfurth and LaFerla, 2010; Rocca et al., 2011b; Ziegler-Graham et al., 2008). Even familial forms of the disease are rarely expressed clinically before the fifth decade of life (Ridge et al., 2013). Thus, a better understanding of how old age contributes to AD pathogenesis will likely provide critical clues on potential treatments. Strikingly, thermoregulatory deficits

appear at the same time in life when the incidence of AD greatly increases (Degroot and Kenney, 2007; Florez-Duquet and McDonald, 1998). In fact, mean body temperature in the elderly has been long known to be lower than in young people and below 37°C (Gomolin et al., 2005; Hoshino et al., 2007; Howell, 1975), increasing their risk of hypothermia (Fox et al., 1973; Whittington et al., 2010). Furthermore, several other parameters linked to thermoregulation are affected in the elderly: energy metabolism (Cunnane et al., 2011; Frisard et al., 2007), thermogenic activity of brown adipose tissue (BAT) (Cypess et al., 2009), ability to recover after cold exposure (Florez-Duquet and McDonald, 1998; Sugarek, 1986) and circadian cycles of body temperature (Weinert, 2010).

Preclinical investigations in animal models have brought potential mechanisms coupling thermoregulatory deficits to AD pathogenesis. Most prominently, hypothermia in mice has been repeatedly shown to increase tau phosphorylation and pathology in the brain (Planel et al., 2009; 2004; Vandal et al., 2016), one of the main neuropathological markers of AD (Cowan and Mudher, 2013; Frost et al., 2014; Tremblay et al., 2007). Although the link between lower body temperature and tau phosphorylation was evidenced in multiple experiments, to our knowledge, no study investigated the role of age in this mechanism.

Since the appearance of thermoregulation deficits coincides with a higher incidence of AD and that a lower body temperature has been repeatedly shown to increase tau phosphorylation (Arendt, 2003; Planel et al., 2007; Whittington et al., 2010), we aimed to verify whether this post-translational mechanism was potentiated in old mice compared to younger mice. Using 6- and 18-month-old mice exposed to 4°C during 24 hours, we found that cold exposure led to a higher increase in soluble phosphorylated tau in old compared to young mice. In parallel, only young mice displayed higher levels of the inactivated form of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in the cortex following cold exposure, suggesting that GSK3 $\beta$  inactivation is a potential protective mechanism against tau hyperphosphorylation that is lost in old animals.

## **1.4. Methods**

### **1.4.1. Animals and cold exposure**

All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Institutional Committee of the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL). 6- and 18-month-old C57BL6/129SvJ mice produced at our animal facility were used in equal number of males and females in each group. One animal per cage was housed at 4°C or 22°C during 24 hours. Body temperature was determined rectally with an electronic thermometer coupled with a rectal probe before and after exposure at the same hour of the day (8 a.m.). All mice were kept under their housing temperature (4°C or 22°C) until sacrifice by



intracardiac perfusion as described elsewhere (Julien et al., 2009). Although it is known that anesthesia has an effect per se on body temperature (Lenhardt, 2010), all mice were put under deep anesthesia with ketamine/xylazine injection (100 mg/kg ketamine, 10 mg/kg xylazine) for ethical reasons. Rapidly, interscapular brown adipose tissue and brain were dissected and frozen at -80°C until processing for Western blot. In a separate experiment, we found that exposure to 4°C for 24 hours prior to anesthesia significantly aggravated the ketamine-induced decrease in body temperature ( $-3.23 \pm 0.64^\circ\text{C}$ ,  $n=7$ ) compared to exposure to room temperature ( $-1.61 \pm 0.59^\circ\text{C}$ ,  $n=7$ ).

#### 1.4.2. Protein extraction and Western immunoblotting

The protein extraction method results in a TBS-soluble intracellular and extracellular fraction (cytosolic fraction), a detergent-soluble fraction (membrane fraction) and a detergent-insoluble fraction solubilized in formic acid as previously described (Lebbadi et al., 2011). The detailed method for Western immunoblotting is described elsewhere (Vandal et al., 2014b). The list of primary antibodies used in our experiments is available in supplementary Table 1.1. All brain homogenates from the same experiment were put on the same gel but consecutive bands were not taken for all representative photo examples.

#### 1.4.3. Quantitative real-time PCR

The expression level of uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA was determined in brown adipose tissue using a reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR). Frozen brown adipose tissues were powderized and 10 mg of each sample was homogenized in 1mL QIAzol lysis reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) to which was added 200  $\mu\text{L}$  chloroform (J.T. Baker, Center Valley, PA, USA). RNA was extracted with an RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The High Capacity cDNA Reverse Transcription kit with random hexamer primers and MultiScribe Reverse Transcriptase (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) was used to synthesize complementary DNA (cDNA) according to the instructions from the manufacturer. Then, TaqMan qPCR primers were used to amplify mouse UCP1 (TaqMan Gene Expression Assays, Mm01244861\_m1 from Life Technologies) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Mm99999915\_g1, Life Technologies) as the housekeeping gene. Reactions were prepared in triplicates and cycle threshold (Ct) values were measured using a real-time qPCR cycler (MxPro-Mx3005P, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) in 96-well optical plates covered with optical adhesive film. Each run contained a “no template” control for both genes. The delta delta Ct (ddCT) method was used to evaluate differences in relative gene expression between groups using GAPDH as a control gene. Results are presented as ratios of UCP1/GAPDH cDNA on control group.

#### 1.4.4. Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  SEM or as relative change observed in cold-exposed mice compared to control mice. Statistical analysis and number of mice per group are specified in each Figure. Bartlett's tests were used to rule out inequality of variances between the groups. One-way (one independent variable) or two-way ANOVA (two independent variables) were used when more than two groups were compared. ANOVAs were followed by Tukey's post-hoc analysis in case of equal variance or by a Dunnett's post-hoc analysis in case of unequal variances. An unpaired Student's t-test was performed when only two groups were compared, with a Welch correction when variances were not equal. Correlations between variables were investigated using linear regression analyses. All statistical analyses were performed with Prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) or JMP (version 12.1.0; SAS Institute Inc., Cary, IL) software and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 1.5. Results

### 1.5.1. Enhanced cold-induced phosphorylation of soluble tau in old mice compared to young mice.

Cold exposure at 4°C is a classical method to study non-shivering thermogenesis in rodents (Cannon and Nedergaard, 2010; S. Lim et al., 2012). Thus, we first confirmed that cold exposure induced a decrease in body temperature and an increase in thermogenesis, as indexed by the enhanced ratio of UCP1 on GAPDH expression in BAT compared to animals maintained at 22°C. However, no significant differences in body temperature or BAT activation were detected between 6- and 18-month-old mice (Fig. 1.1A-B).

Given the importance of tau phosphorylation in AD pathogenesis (Cowan and Mudher, 2013; Frost et al., 2014; Querfurth and LaFerla, 2010; Tremblay et al., 2007), we then assessed the extent by which cold exposure potentiates the phosphorylation of key epitopes. We found that 18-month-old mice displayed a greater hyperphosphorylation of tau in response to cold exposure. More specifically, although cold exposure increased the phosphorylation of tau at epitopes pSer396/404 in young mice (+40%) and pSer202 in both 6- and 18-month-old mice (+101% and +132%, respectively), only old mice displayed an increase in pThr181 and pThr231 (+41% and +61%, respectively) (Fig. 1.1C-D). Two-way ANOVA further confirmed the upregulating effect of a lower temperature on phosphorylated tau species in the soluble fraction ( $P = 0.0001$  for pSer202;  $P = 0.026$  for pThr231 and  $P = 0.031$  for pThr181).

Interestingly, the phosphorylation of soluble tau in response to cold exposure was correlated with body temperature suggesting that both events are linked. In fact, we found that tau pSer202 was correlated with

body temperature in both 6- and 18-month-old mice ( $r^2=0.16$  and  $0.43$ , respectively) (Fig. 1.1E). However, phosphorylation levels of soluble tau at pThr231 and pThr181 were correlated with body temperature only in old mice ( $r^2= 0.29$  and  $r^2=0.47$ , respectively), not in young ones (Fig. 1.1F-G).

### 1.5.2. GSK3 $\beta$ inactivation in young but not in old mice.

Since tau phosphorylation is regulated by kinases and phosphatases (J.-Z. Wang et al., 2013), we next measured several of these key enzymes in cortex homogenates of young and old mice. No significant changes were found in main phosphatases and kinases (Fig. 1.1I-L) after exposure to 4°C, although two-way ANOVA revealed that older age was associated with a higher pAKTSer473/AKT ratio ( $P = 0.038$ ). In particular, the activated form of GSK3 $\beta$  (pTyr216) was unchanged by cold exposure in both young and old mice. However, the inactivated form (pSer9) was 49% higher in cortex homogenates of 6-month-old mice exposed to cold compared to those at room temperature, a finding not observed in 18-month-old mice (Fig. 1.1K-L).

## 1.6. Discussion

In the present study, we do not only confirm previous observations suggesting that lower body temperature increases the phosphorylation of soluble tau in the cerebral cortex of cold-exposed mice (Planel et al., 2007; Vandal et al., 2016), but we more importantly propose that old age worsens this phenomenon. We also identified that a loss of protective kinase-related mechanisms could underlie the observed higher tau phosphorylation in old mice. These findings provide a potential mechanistic explanation on how old age promotes the translation of thermoregulatory deficits into aggravated AD-like neuropathology, thereby shedding light on why old age is the main risk factor for AD.

The cerebral accumulation of hyperphosphorylated tau is considered as one of the main neuropathological hallmarks of AD (Frost et al., 2014; Querfurth and LaFerla, 2010). Our first series of investigations focused on indexing the hyperphosphorylation status of soluble tau, which is thought to precede pathological aggregation and formation of intraneuronal NFT (Avila et al., 2004; Buée et al., 2000). In particular, pThr231 tau is believed to initiate the tau hyperphosphorylation cascade (Martin et al., 2011). Further supporting the relevance of the phosphorylation of soluble tau to AD symptoms, we previously showed that both pSer396/404 and pThr231 tau correlate with ante-mortem cognitive performance in AD, mild cognitive impairment (MCI) and non-demented subjects from the Rush religious Order study (Bennett et al., 2004; Calon et al., 2015). The present

data corroborate previous reports of increased tau phosphorylation following reduction in body temperature: tau phosphorylation at pSer202, pThr231 and pThr181 are all increased in hibernators (Arendt et al., 2003), whereas pSer202 and pThr181 tau in murine brain were consistently shown to be increased after an anesthesia-induced decrease in body temperature (Planel et al., 2007; Run et al., 2009). Interestingly, reduced body temperature correlated with increased phosphorylation of soluble tau, further strengthening the link between a lower body temperature and a higher phosphorylation of soluble tau species, especially at older ages.

The phosphorylation of tau is regulated by several kinases *in vivo*, such as cdk5, CAMKII and JNK (J.-Z. Wang et al., 2013), but GSK3 $\beta$  is the most prominent (Kremer et al., 2011; Takashima, 2006). We found that 6-month-old mice, following cold exposure, not only displayed a smaller increase in soluble tau phosphorylation compared to old animals, but also showed higher levels of the inactivated form (pSer9) of GSK3 $\beta$ . Similar signs of GSK3 $\beta$  inactivation are found in the forebrain of hibernating squirrels compared to summer-active animals (Su et al., 2008). A possible interpretation is that young mice prevent the pathological increase in tau phosphorylation by reducing the activity of GSK3 $\beta$ .

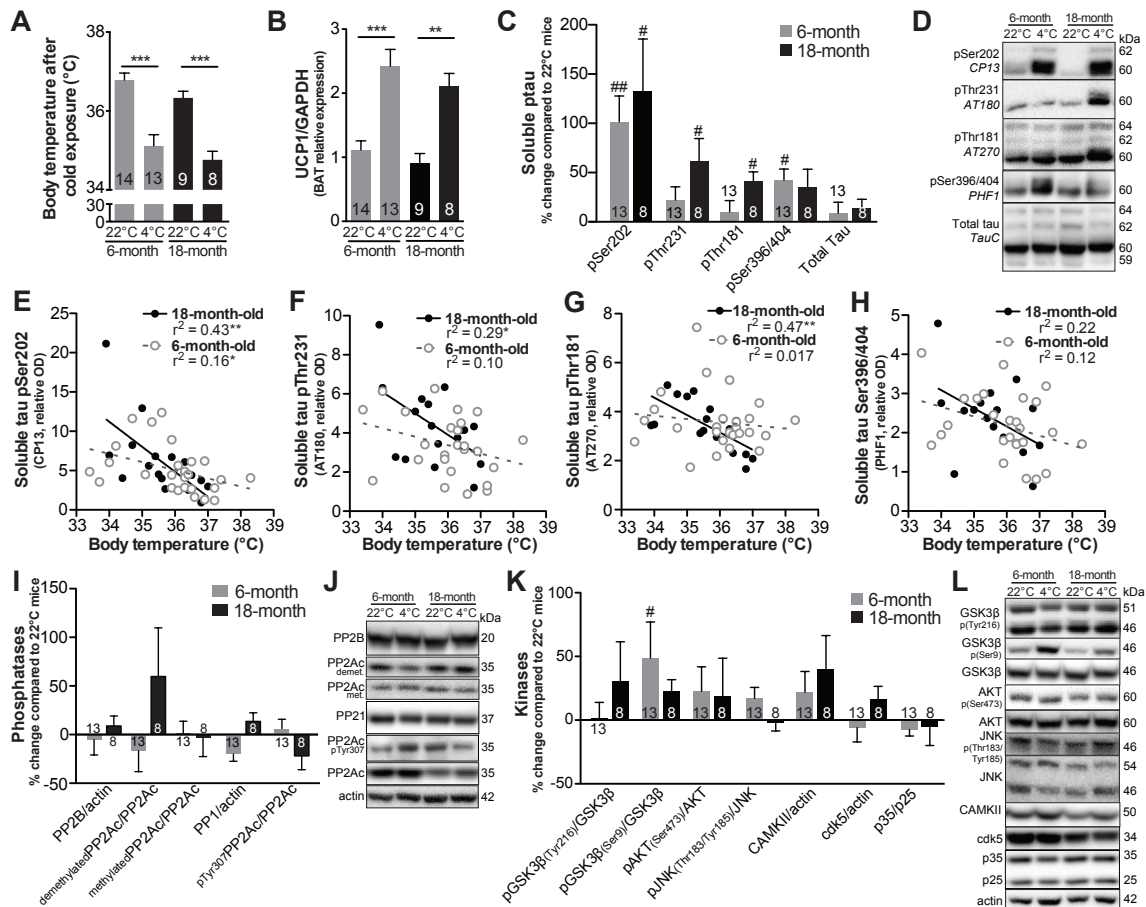
In summary, the present results suggest that a 2°C decrease in body temperature enhances tau phosphorylation in the brain cortex more importantly in old mice compared to young ones. From this, it could be speculated that the 0.5°C reduction of body temperature reported in the elderly (between people 65 to 74 years of age and people over 85 years of age) (Gomolin et al., 2005) could promote the phosphorylation of tau in the brain over time and contribute to AD pathogenesis (Whittington et al., 2010). If true, this would mean that old age confers a higher susceptibility to changes in body temperature, thereby enhancing the risk of developing AD. Finally, a defect in kinase deactivation in old age stands as a potential mechanism linking thermoregulation and tau phosphorylation. In the light of these results, it is postulated that improving natural thermoregulatory mechanisms in the elderly could be a novel therapeutic strategy for AD.

## **1.7. Acknowledgements**

This study was made possible by funding from the Alzheimer Society Canada (15-12), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP 102532 and IAO 74443) and the Canadian Foundation for Innovation (CFI). Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQ-S) provided salary support to Frédéric Calon. Marine Tournissac was supported by scholarships from Fonds d'Enseignement et de la Recherche from the Faculty of

Pharmacy, Laval University. Dr. Frederic Calon is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. The authors have no conflict of interest to declare. The authors are grateful to Dr Sébastien Hébert for his qPCR equipment.

## 1.8. Figures



**Figure 1.1. Cold exposure increases phosphorylation of soluble tau more importantly in old mice, while inactivating GSK3β only in young mice.**

(A) Body temperatures of 6- and 18-month-old mice after exposure to 4°C or 22°C during 24 hours were determined using a rectal probe. (B) Ratio of UCP1 on GAPDH gene expression in BAT, as quantified with qPCR. (C, D) Relative changes in soluble tau phosphorylation measured by Western blot in cortex homogenates at different sites: pSer202, pThr231, pThr181, pSer396/404 (total soluble tau was unchanged).

(E-H) Correlations between soluble tau pSer202, pThr231, pThr181 and pSer396/404 measured by Western blot in cortex homogenates and body temperatures measured with a rectal probe of 6- and 18-month-old mice. Relative changes in (I, J) phosphatases and (K, L) kinases of 6- and 18-month-old mice exposed to 4°C compared to mice exposed to 22°C during 24 hours measured by Western blot in the cytosolic fraction of cortex homogenates. No change was found between 6- and 18-month-old mice. Data are shown as mean ± SEM. Data from the rectally-assessed body temperature and the BAT content of UCP1 mRNA were compared using an one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc analysis: \*p<0.05; \*\*p<0.01. Percent change = ((value 4°C – mean 22°C) / mean 22°C) x 100. Data from mice exposed to 4°C were compared with those exposed to 22°C using unpaired t-tests: #p<0.05; ##p<0.01. Pearson's coefficients (r<sup>2</sup>) were determined using linear regression: \*p<0.05; \*\*p<0.01. PP2B: protein phosphatase 2B; PP1: protein phosphatase 1; PP2Ac: protein phosphatase 2A, catalytic subunit; GSK3β: glycogen synthase kinase 3β; AKT: protein kinase B; JNK: c-Jun N-terminal kinase; CAMKII: calmodulin-dependant protein kinase II; cdk5: cyclin-dependant kinase 5; p35: protein kinase 35; p25: protein kinase 25.

## 1.9. Supplementary data

Antibody	Clone	Specificity	Host	Source
Actin		β-actin	Mouse	Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada)
AKT	polyclonal	AKT a.a. 345-480	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
AKT (phospho)	polyclonal	AKT, phosphorylated at Ser-473	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
CAMKII	6G9	CAMK2 alpha subunit (alpha, beta and gamma isoforms)	Mouse	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
CAMKII (phospho)	polyclonal	CAMK2, phosphorylated at Thr-286	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Cdk5	polyclonal	peptide mapping at the C-terminus of Cdk5 of human origin	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
GSK3β		Rat GSK-3β aa. 1-160	Mouse	BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada)
GSK3β (phospho)	polyclonal	GSK3β, phosphorylated at Ser-9	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
GSK3β (phospho)	polyclonal	GSK3β, phosphorylated at Tyr-216	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
JNK	polyclonal	Whole SAPK/JNK protein	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
JNK (phospho)	polyclonal	p46/p54 SAPK/JNK, phosphorylated at Thr-183 and Tyr 185	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
p35/25 (C64B10)	polyclonal	C-terminus of p35	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PP1	monoclonal	Full-length PP1-α	Mouse	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
PP2AC	polyclonal	PP2A catalytic subunit (α and β isoforms)	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PP2Ac methylated	monoclonal	methylated form of PP2A catalytic subunit	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
PP2Ac demethylated	monoclonal	unmethylated c-terminal region of the PP2A catalytic subunit	Mouse	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
PP2B	polyclonal	Whole Calcineurin A protein (alpha, beta and gamma isoforms)	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Tau (total)	polyclonal	c-terminal region of tau protein	Rabbit	Dako (Burlington, ON, Canada)
Tau (phospho)	AT180	Tau, phosphorylated at Thr-231	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
Tau (phospho)	AT270	Tau, phosphorylated at Thr-181	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
Tau (phospho)	CP13	Tau, phosphorylated at Ser-202	Mouse	Generous gift from Peter Davies
Tau (phospho)	PHF1	Tau, phosphorylated at Ser-396 and Ser-404	Mouse	Generous gift from Peter Davies

Supplementary Table 1.1. Antibodies used in the study.

**Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent un modèle murin de la maladie d'Alzheimer de la phosphorylation de tau induite par le froid.**

# Repeated cold exposures protect a mouse model of Alzheimer's disease against cold-induced tau phosphorylation

Marine Tournissac<sup>1,2</sup>; Philippe Bourassa<sup>1,2</sup>, Ruben D. Martinez-Cano<sup>2</sup>, Tra-My Vu<sup>2</sup>, Sébastien S. Hébert<sup>2,3</sup>, Emmanuel Planel<sup>2,3</sup>, Frédéric Calon<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Neurosciences Axis, CHU de Québec-Université Laval Research Center, Quebec City, Qc, Canada;

<sup>3</sup>Department of Psychiatry and Neuroscience, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada.



## 1.1. Résumé

Le pic d'incidence de la maladie d'Alzheimer (MA) survient au même moment qu'un déficit de thermorégulation à un âge avancé. Suggérant un lien entre les deux, l'hypothermie induit l'hyperphosphorylation de tau (pTau). La stimulation du tissu adipeux brun (TAB) contrecarre les désordres métaboliques. Pour vérifier si la stimulation du TAB pouvait interférer avec la neuropathologie Alzheimer, des 3xTg-AD de 15 mois ont reçu des expositions répétées au froid (ERF), consistant à des expositions de 4h à 4°C, 5 fois par semaine pendant 4 semaines, tandis qu'un groupe est resté à 22°C. Les 3xTg-AD acclimatées au froid présentaient une meilleure thermogénèse et tolérance au glucose. Ces souris étaient complètement résistantes à pTau induite par une exposition au froid de 24h. L'ERF augmentait les niveaux plasmatiques du facteur de croissance 21, qui étaient corrélés avec les niveaux de pTau hippocampiques. Ces résultats suggèrent qu'améliorer la thermogénèse pourrait être bénéfique dans la MA.

## 1.2. Abstract

Old age is associated with a rise in the incidence of Alzheimer's disease (AD) but also with thermoregulatory deficits. Indicative of a link between the two, hypothermia induces tau hyperphosphorylation. The 3xTg-AD mouse model not only develops tau and amyloid pathologies in the brain, but also metabolic and thermoregulatory deficits. Brown adipose tissue (BAT) is the main thermogenic driver in mammals and its stimulation counteracts metabolic deficits in rodents and humans. We thus investigated whether BAT stimulation impedes AD neuropathology. 15-month-old 3xTg-AD mice were subjected to repeated short cold exposures (RSCE), consisting of 4-hour sessions of cold exposure (4 °C), five times per week for four weeks, compared to animals kept at housing temperature. First, we confirmed that 3xTg-AD RSCE-trained mice exhibited BAT thermogenesis and improved glucose tolerance. RSCE-trained mice were completely resistant to tau hyperphosphorylation in the hippocampus induced by a 24-hour cold challenge. Finally, RSCE increased plasmatic levels of fibroblast growth factor 21 (FGF21), a batokine, which correlated with hippocampal tau phosphorylation. Overall, BAT stimulation through RSCE improved metabolic deficits and completely blocked cold-induced tau hyperphosphorylation in the 3xTg-AD mouse model of AD neuropathology. These results suggest that improving thermogenesis could exert a therapeutic effect in AD.

### 1.3. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by disrupted cognitive functions and is diagnosed neuropathologically by the presence of tau-laden neurofibrillary tangles and A $\beta$ -loaded plaques (Tremblay et al., 2017; 2007). The principal risk factor for developing AD is unquestionably old age (Scheltens et al., 2016). Therefore, a better understanding of pathological changes triggered by old age could reveal new clues in AD pathogenesis. Among the changes that come with aging, thermoregulatory deficits are frequently reported. Indeed, elderly individuals regulate their core temperature less efficiently than younger adults (Degroot and Kenney, 2007), and many of them have subnormal body temperatures during the day (Collins, 1995; Gomolin et al., 2005), along with decreased basal metabolism (Frisard et al., 2007). Interestingly, the appearance of defects in maintaining optimal body temperature roughly coincides with a rise in the incidence of AD in this population.

Animal studies are providing new lines of evidence suggesting that thermoregulatory deficits contribute to AD pathogenesis. It has been repeatedly shown in the rodent brain that a decrease in body temperature induces tau hyperphosphorylation (Le Freche et al., 2012; Planel et al., 2009; 2004; Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016), one of the main neuropathological markers of the disease (Tremblay et al., 2017; 2007). Our studies in animal models show that both aging and AD pathology potentiate the rise in tau phosphorylation following acute exposure to cold (4 °C, 24h) (Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016). For instance, compared to non-transgenic mice, the 3xTg-AD mouse model of AD has a lower basal body temperature that worsens with age and the progression of the neuropathology. Interestingly, cold exposure was shown to aggravate AD neuropathology, while thermoneutrality (28 °C) improved both AD-related neuropathologies and cognitive impairment (Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016).

Thermoregulatory deficits can also be interpreted as part of the general metabolic failure that is believed to occur in AD. Strong pathogenic links between AD and diabetes have been revealed in numerous reports in recent years, as type 2 diabetes is now considered a risk factor for developing AD (Baglietto-Vargas et al., 2016; Chatterjee et al., 2016). Reciprocally, AD patients display lower brain glucose metabolism and impaired insulin signaling (An et al., 2018; Arnold et al., 2018). In addition, peripheral metabolic deficits have been observed in animal models expressing AD neuropathology (Vandal et al., 2015b). Interestingly, mouse models of diabetes and obesity also display thermoregulatory deficits associated with higher tau phosphorylation, further supporting a close relationship between type 2 diabetes and AD (El-Khoury et al., 2016; Gratuze et al., 2017a). Not surprisingly, numerous antidiabetic drugs have been tested for AD in preclinical and clinical

studies, including insulin, thiazolidinediones, metformin and GLP-1 analogs (Vandal et al., 2014b; Yarchoan and Arnold, 2014).

One promising strategy for simultaneously correcting thermoregulatory and metabolic deficits is through the stimulation of brown adipose tissue (BAT) thermogenesis. BAT is the main thermogenic tissue in mammals. It burns fat and glucose to produce heat that dissipates throughout the body via blood flow (Cannon and Nedergaard, 2004). Hence, the activation of BAT has been considered as a potential drug target for type 2 diabetes and obesity for a long time (de Souza and Burkey, 2001), with renewed interest following the demonstration that (i) BAT is functional in adults (Cypess et al., 2009) and (ii) BAT activity can be modulated through cold exposure or drugs (P. Lee and Greenfield, 2015). In addition, active BAT has the remarkable ability to improve glucose tolerance and insulin sensitivity (Chondronikola et al., 2014; Stanford et al., 2013). Since older individuals experience a decrease in BAT activity (Ouellet et al., 2011), they are likely to benefit the most from BAT stimulation.

BAT is not only a modulator of energy homeostasis, but is also an endocrine organ that secretes metabolic regulators or adipokines, also called batokines, such as fibroblast growth factor 21 (FGF21), adiponectin, and interleukin 6 (IL-6) (Villarroya et al., 2017). Interestingly, FGF21 was shown to reverse high-fat diet-induced cognitive defects in rats (Sa-Nguanmoo et al., 2016b), reduce blood-brain barrier disruptions in db/db mice (Yu et al., 2018), act as a neuroprotective agent against glutamate-induced excitotoxicity in primary rat brain neurons (Leng et al., 2015; Z. Wang et al., 2016) and protect against A $\beta$ 42 toxicity in vitro (Amiri et al., 2018).

To our knowledge, no study has investigated the stimulation of BAT thermogenesis in the context of AD. Given that BAT is involved in multiple pathways in AD pathogenesis, we hypothesized that correcting thermoregulatory impairments through BAT stimulation could exert benefits on metabolic and neuropathological endpoints in a mouse model of AD. Repeated short cold exposures (RSCE) is a standardized procedure to stimulate BAT growth and activity that has been shown to increase energy expenditure and improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rodents (Labbé et al., 2016; Ravussin et al., 2014; T.-Y. Wang et al., 2015) and humans (Blondin et al., 2014; Hanssen et al., 2015b; P. Lee et al., 2014).

We thus applied RSCE to a mouse model of AD (the 3xTg-AD mouse) that reproduces both metabolic and thermoregulatory deficits along with the development of tau and amyloid pathologies in the brain (Oddo et al., 2003b; Vandal et al., 2016; 2015b; 2014b). Our objective was to determine whether stimulating BAT thermogenesis could be a potential therapeutic strategy in AD.

## 1.4. Methods

### 1.4.1. Animals and diet

Thirteen-month-old 3xTg-AD (APP<sub>swe</sub>, PS1<sub>M146V</sub>, tau<sub>P301L</sub>) mice produced at our animal facility were used in equal numbers of males and females in each group. Mice from our colony were fed the same chow (Teklad 2018, Harlan Laboratories, Canada) from breeding to 13 months of age. From 13 to 16 months, mice were fed a 20% (w/w) of total fat diet to be more representative of a human “Western diet” and to potentiate metabolic defects previously observed in old 3xTg-AD mice (Vandal et al., 2015b). The diet was manufactured by Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ) and is described in detail in Supplementary table 2.1. We used purified diet formulations standardized to ensure consistency and eliminate batch-to-batch variations, containing measured concentrations of macronutrients, vitamins, and minerals. All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Institutional Committee at the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL).

### 1.4.2. Cold exposures

From 15 to 16 months, animals were housed one per cage to avoid mutual heating. A control group remained at housing temperature (22 °C) for the duration of the study (Figure 2.1A). The “Acute” group underwent a 24-hour period of exposure at 4 °C, without adaptation, just before sacrifice to assess thermoregulatory capacity. A third group (“Repeated”) underwent RSCE consisting of 4-h exposure at 4 °C (from 10 a.m. to 2 p.m.), five days per week for four weeks. This RSCE protocol sums up to a total of 18 4-h sessions of short exposure to cold. Then, animals underwent a final 24-hour exposure at 4 °C (from 9 a.m. to 9 a.m., identical to the ‘Acute’ group) at the end of the fourth week (Figure 2.1A) (Labbé et al., 2016; Ravussin et al., 2014; T.-Y. Wang et al., 2015). To minimize stress variability between the groups, all animals were moved from the housing room to the room next to the cold chamber. Body temperature was determined using an electronic thermometer coupled with a rectal probe before and after exposure at the same time of the day. All mice were sacrificed by intracardiac perfusion at their respective temperatures (4 °C or 22 °C) as described previously (Vandal et al., 2016). Although it is known that anesthesia affects body temperature (Lenhardt, 2010), all mice were put under deep anesthesia with ketamine/xylazine i.p. injection (100 mg/kg ketamine, 10 mg/kg xylazine) for ethical reasons a few minutes before intracardiac perfusion. Interscapular BAT, gastrocnemius muscles and brains were rapidly dissected and frozen at -80°C until processed.

### 1.4.3. Glucose tolerance test

Glucose tolerance test (GTT) was performed after the fifteenth short cold exposure, or after three weeks of RSCE, during the few days without short cold exposure (Figure 1A). “Control” and “Acute” groups were pooled under the “Control” group because at the time of the GTT, “Acute” mice did not yet undergo the acute exposure to cold (24h, 4 °C) and were still in the same conditions as the “Control” group (22 °C). In addition, it was not possible to test the mice after the final 24-h acute cold exposure because mice were immediately sacrificed at 4 °C. Sixteen-month-old 3xTg-AD non-exposed and RSCE mice (after the fifteenth exposure) were fasted for 6 h. Glucose at 1 g/kg was injected i.p. and blood glucose was measured over a 2-h period with a glucometer (OneTouch UltraMini; LifeScan, Milpitas, CA) using a blood drop sampled from the saphenous vein.

### 1.4.4. Protein extraction

For the parieto-temporal cortex, protein extraction method results in a TBS-soluble intracellular and extracellular fraction (cytosolic fraction), a detergent-soluble fraction (membrane fraction) and a detergent-insoluble fraction (resuspended in formic acid) as previously described (St-Amour et al., 2014). For the hippocampus, frozen samples were directly homogenized in a lysis buffer containing detergents that results in a detergent-soluble fraction (cytosolic and membrane fraction). The pellets remaining from ultracentrifugation were resuspended in formic acid (detergent-insoluble fraction). Proteins from the BAT and gastrocnemius muscles were extracted in the lysis buffer only.

### 1.4.5. Western immunoblotting

The detailed method for Western immunoblotting is described elsewhere (Vandal et al., 2015b). The list of primary and secondary antibodies used in our experiments is available in Supplementary Table 2.4. Homogenates were all run on the same gel for each experiment. Proteins extracted from the hippocampus of tau KO mice were added in immunoblotting experiments with tau antibodies as a negative control, as described (Petry et al., 2014).

#### 1.4.6. A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 quantification

For  $\beta$ -Amyloid ELISA, protein extracts from the parieto-temporal cortex were used. A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 were measured in TBS-soluble and detergent-insoluble fractions using a human  $\beta$ -Amyloid ELISA (Wako, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions (St-Amour et al., 2014). Plates were read at 450 nm using a Synergy<sup>TM</sup> HT multidetection microplate reader (Biotek, Winooski, VT).

#### 1.4.7. Quantitative real-time PCR

The expression levels of uncoupling protein 1 (*Ucp1*, TaqMan Gene Expression Assays, Mm01244861\_m1, Life Technologies), *Fgf21* (TaqMan Gene Expression Assays, Mm00840165\_g1, Life Technologies) and  $\beta$ 2-microglobulin ( *$\beta$ 2mg*, Mm00437762\_m1, Life Technologies) mRNA were determined in BAT using a reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) as previously described (Tournissac et al., 2017). The delta delta Ct (ddCT) method was used to evaluate differences in relative gene expression between groups using  *$\beta$ 2mg* as the control gene. Results are presented as ratios of *Ucp1*/ *$\beta$ 2mg* or *Fgf21*/ *$\beta$ 2mg* cDNA in relation to the control group.

#### 1.4.8. FGF21 assay

Levels of FGF21 were determined in plasma sampled before intracardiac perfusion in non-fasted mice and in BAT protein extracts using the mouse/rat FGF21 Quantikine ELISA kit (MF2100, R&D systems, Minneapolis, MN).

#### 1.4.9. Triglycerides assay

Levels of triglycerides were measured in plasma sampled before intracardiac perfusion in non-fasted mice using the Thermo Scientific Triglycerides Reagent assay (TR22421, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### 1.4.10. Histology and UCP1 immunostaining

Visceral (perirenal and epididymal) and subcutaneous (inguinal) fat pads were sampled and weighed. Epididymal fat was post-fixed for 48 h in 4% paraformaldehyde (pH 7.4). Samples were then transferred in

PBS until embedding in paraffin. Samples were sectioned in 10- $\mu$ m-thick slices and mounted. For adipocytes quantification, slices were stained in hematoxylin and eosin (H&E) as described elsewhere (Vandal et al., 2014b). Adipocytes area and number were quantified using ImageJ software (version 1.50i, NIH, Bethesda, MA, USA). For UCP1 immunostaining, slices were first deparaffinized, followed by antigen retrieval with a boiling 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for 30 min and inhibition of endogenous peroxidases with a 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Mounted sections were then washed twice in PBS with 0.4% Triton X-100 (PBS-T) and 1% horse serum for 10 min before blocking with 5% horse serum in PBS-T solution for 30 min. Slices were incubated overnight at 4 °C in a humid chamber with a rabbit UCP1 antibody (1:200, Ab10983, Abcam, Cambridge, United Kingdom) in a 1% horse serum PBS-T solution. Sections were then washed twice in PBS-T for 10 min before a 1-h incubation period with a goat anti-rabbit biotinylated antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch, PA, USA). Mounted sections were then washed twice in PBS-T and an avidin/horseradish peroxidase complex (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) was added for 35 min following the manufacturer's guidelines. After two washes, a 0.3 mg/mL 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 0.03% hydrogen peroxide in acetate buffer was added for detection. The reaction was stopped by extensive washings in PBS, and sections were then coverslipped with Mowiol mounting medium. Images were taken with an EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Optical density was quantified with ImageJ software (NIH, version 1.50i).

#### 1.4.11. Corticosterone ELISA

Corticosterone levels were measured in plasma sampled from the saphenous vein just before and after moving to the cold chamber in non-fasted mice following the manufacturer's instructions (Ab108821, Abcam, Cambridge, United Kingdom).

#### 1.4.12. Statistical analysis

Data are represented as a mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), except for Supplementary table 2.2 and 2.3 in which data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The statistical analysis and the number of mice per group are specified in each figure. Bartlett's tests were used to rule out inequality of variances between groups. One-way (one independent variable) or two-way (two independent variables) ANOVAs were used when more than two groups were compared. ANOVAs were followed by a Tukey's post-hoc analysis in cases of equal variance. In cases of unequal variance, a Kruskal Wallis followed by a Dunn's post-hoc test

was performed. Repeated measures two-way ANOVAs followed by a Bonferroni's post-test were executed to compare recurrent measurements in the same animals. An unpaired Student's t-test was performed when only two groups were compared. One sample t-test was used to compare means to a theoretical value. Correlations between variables were investigated using linear regression analyses. All statistical analyses were performed with Prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) or JMP (version 12.1.0; SAS Institute Inc., Cary, IL, USA) software and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 1.5. Results

### 1.5.1. Repeated short cold exposures potentiate BAT thermogenic capacity and protect old 3xTg-AD mice against cold-induced decreases in body temperature

RSCE is a standardized procedure to stimulate BAT growth and thermogenesis activity (Labbé et al., 2016; Ravussin et al., 2014; T.-Y. Wang et al., 2015). Corticosterone levels were measured in plasma sampled before and after the first and the thirteenth RSCE to confirm that stress was equivalent between cold-exposed and non-exposed mice (Supplementary figure 2.1). We first observed that mice in the RSCE group became resistant to cold-induced decreases in body temperature from the sixth cold exposure session onward, as shown by a non-significant change before and after short exposures (Figure 2.1B and Supplementary figure 2.2 for raw data). We confirmed that *Ucp1* mRNA expression in BAT was increased by cold exposure, after a single acute episode (24 hours at 4 °C) or at the end of the RSCE session (Figure 2.1C), while  $\beta 3$  adrenergic receptors ( $\beta 3$ AR) were not affected by RSCE (Figure 2.1E,G). BAT weights were reduced by acute cold exposure, possibly due to brown adipocyte shrinkage following lipid consumption to produce heat (Figure 2.1D). We also found an increase in SIRT3 in the BAT of repeatedly cold-exposed mice (Figure 2.1F,G), a protein expressed in mitochondria of BAT after fasting or cold exposure conditions (Ahn et al., 2008; Cheng et al., 2016; T. Shi et al., 2005), further evidencing that RSCE efficiently stimulated BAT thermogenesis. Since RSCE may improve whole-body thermogenesis not only through BAT stimulation, we assessed non-shivering activity in muscles through sarcolipin protein (Supplementary table 2.2) (Bal et al., 2012). However, we did not observe any significant increase in muscular proteins involved in thermogenesis. Finally, a trend toward a "browning" phenotype was observed in the white adipose tissue (WAT) of repeatedly cold-exposed mice with UCP1 staining (Figure 2.1H), although the quantification of the optical density of UCP1 staining was not statistically different from control mice (Figure 2.1I).



### 1.5.2. Repeated short cold exposures improve glucose tolerance in 16-month-old 3xTg-AD mice

Increased BAT thermogenesis activity leads to improved metabolic outcomes, including glucose tolerance in rodents (T.-Y. Wang et al., 2015). We took advantage of the fact that 3xTg-AD mice on a Western diet display metabolic defects with age (Vandal et al., 2015b) to assess the impact of RSCE. All animals gained weight (approximately 15%) after the introduction of the Western diet and RSCE did not significantly alter the final body or white adipose tissue weight (Figure 2.2A,B,F). The number and area of white adipocytes were not significantly modified by the RSCE (Figure 2.2G-I). However, RSCE improved glucose tolerance as RSCE mice displayed a large decrease in blood glucose 30 minutes post-injection and a smaller area under the curve, compared to non-exposed 3xTg-AD mice (Figure 2.2C,D), without modification of fasting insulin (Figure 2.2E). Finally, circulating triglycerides levels were halved by both RSCE and acute cold exposure (4 °C, 24h) (Figure 2.2J).

### 1.5.3. Repeated short cold exposures protect old 3xTg-AD mice against cold-induced tau phosphorylation

Tau phosphorylation is one of the main neuropathological hallmarks of AD, strongly correlating with antemortem cognitive deficits (Tremblay et al., 2017; 2007). Cold-induced tau phosphorylation has been repeatedly observed in non-transgenic and in AD mouse models (Le Freche et al., 2012; Planel et al., 2009; 2004; Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016). In this study, we first confirmed that acute exposure to cold (24h, 4 °C) markedly increased the phosphorylation of soluble tau in the hippocampus of old 3xTg-AD mice (pSer394/404: +87%; pSer202: +211%; pSer202/Thr205: +183%; pThr181: +49% vs. non-exposed mice) (Figure 2.3A-G). As expected, tau phosphorylation strongly correlated with body temperature recorded at sacrifice (Figure 2.3H-J). Interestingly, RSCE completely prevented cold-induced tau hyperphosphorylation in the hippocampus, as the level of tau phosphorylation in RSCE mice was similar to non-exposed mice (Figure 2.3A-G). These results indicate that old 3xTg-AD mice undergoing BAT training with RSCE developed a sufficient thermogenic capacity to maintain their body temperature over a 24-hour cold challenge and thus preserved a level of tau phosphorylation similar to non-exposed mice. However, levels of insoluble tau in the hippocampus remained unchanged between exposed and non-exposed 3xTg-AD mice (Figure 2.3K-O).

We then investigated the impact of RSCE on kinases and phosphatases involved in the phosphorylation of tau in the hippocampus (Figure 2.4A-I). We found that phospho-GSK3 $\beta$  (Ser9) increased after acute cold exposure (4 °C, 24h) but remained equivalent to the control level after RSCE, thus following the same pattern

as tau phosphorylation (Figure 2.4A). In contrast, phospho-GSK3 $\beta$  (Tyr216) levels remained similar in all groups (Figure 2.4B). Levels of phospho-JNK and phospho-AKT also increased following acute cold exposure, but with no significant effect from RSCE (Figure 2.4C,D). No significant changes were found for p25/p35, pCAMKII, pMAPK and PP2Ac (Figure 2.4A-H).

Amyloid pathology accumulates progressively in the 3xTg-AD mice (Oddo et al., 2003b). Here, RSCE and acute cold exposure (4 °C, 24h) had no effect on either soluble or insoluble forms of A $\beta$ 40 or A $\beta$ 42 measured in the parieto-temporal cortex of the mice (Supplementary figure 2.3).

#### 1.5.4. Repeated short cold exposures lead to FGF21 accumulation in plasma

BAT has been recently presented as a secretory organ (Villarroya et al., 2017), communicating with other tissues, including the brain, through the secretion of batokines. Here, we focused on FGF21 because recent studies indicate that this hormone has neuroprotective properties (Amiri et al., 2018; Leng et al., 2015; Sa-Nguanmoo et al., 2016b). We found that plasmatic levels of FGF21 increased by 66% following RSCE compared to control (Figure 2.5A). Surprisingly, plasmatic FGF21 concentrations were negatively correlated with levels of soluble tau pSer231 in the hippocampus of 3xTg-AD mice (Figure 2.5B), suggesting that FGF21 production induced by RSCE could be involved in the observed protection against cold-induced tau phosphorylation. In addition, plasmatic levels of FGF21 were correlated with body temperature recorded just before sacrifice (Figure 2.5C). Since BAT can secrete FGF21, we measured its expression in BAT of old 3xTg-AD mice and found that mice that only underwent the 24-hour cold challenge displayed a non-statistically significant trend toward higher *Fgf21* expression (Figure 2.5D).

## 1.6. Discussion

Based on previous work suggesting that thermoregulatory deficits contribute to AD pathogenesis (Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016), we sought to determine whether stimulation of BAT thermogenesis counteracts metabolic and thermoregulation deficits as well as AD-like neuropathology in an animal model of AD. We opted for a non-pharmacological mean to stimulate thermogenesis, namely RSCE, routinely used in the field of metabolic research, although not specific to BAT (Labbé et al., 2016; Ravussin et al., 2014; T.-Y.

Wang et al., 2015). First, we found that RSCE was effective at increasing BAT thermogenic capacity and improving glucose tolerance in old 3xTg-AD mice. Notably, 3xTg-AD mice trained with RSCE were completely protected from cold-induced tau hyperphosphorylation, a key correlate of AD symptoms in patients. Finally, RSCE increased plasmatic FGF21 levels, a batokine involved in both metabolic improvement and neuroprotection (Sa-Nguanmoo et al., 2016b; Villarroya et al., 2017).

### 1.6.1. Increased thermogenesis capacity following RSCE in old mice

The present data show that RSCE increased BAT thermogenic capacity, as shown by increased BAT *Ucp1* expression and by the capacity of mice to resist cold-induced decreases in body temperature. WAT can also contribute to thermogenesis, although to a lower magnitude compared to interscapular BAT, by adopting a “browning” phenotype (Labbé et al., 2016). Here, we observed such a phenotype through the trend to increase in UCP1 staining in the WAT of repeatedly exposed mice. Since RSCE stimulates whole body thermogenesis and cold acclimation not only through BAT, we also measured markers of muscular thermogenesis but did not observe any modification in the mice repeatedly exposed to cold compared to control. RSCE or cold acclimation in humans have been shown to increase energy expenditure and BAT thermogenic activity (Blondin et al., 2014; Hanssen et al., 2015b; P. Lee et al., 2014). However, studies in the elderly are lacking, possibly due to the risks associated with cold exposure in that population. Thermoregulation is impaired with aging, the BAT is less prominent in the elderly and old mice are more vulnerable to tau hyperphosphorylation induced by cold challenge compared to younger ones (Cypess et al., 2009; Tournissac et al., 2017). Yet, our data confirm that RSCE is an appropriate research tool to investigate the effect of BAT stimulation even in old mice.

It should be noted that animals in our facilities are kept at 22 °C, which is lower than the thermoneutral temperature of the mouse estimated at 28 °C (Cannon and Nedergaard, 2010). A previous study showed that thermoneutrality improves behavior and AD pathology in old 3xTg-AD mice after one week (Vandal et al., 2016). In addition, it is known that, when mice are housed at their thermoneutral temperature, their thermogenesis and sympathetic tone are halted while their adiposity is increased (Cui et al., 2016). Therefore, the present results are valid in the context of mice experiencing mild thermogenesis and could be different at another environmental temperature.

### 1.6.2. RSCE improved peripheral metabolic disorders

Boosting thermogenic capacity could improve AD through different mechanisms. First, improvement in glucose and lipid metabolism, as well as insulin sensitivity, gained with higher thermogenesis may be therapeutic in AD. Type 2 diabetes and obesity are now widely listed among risk factors for developing AD, now increasingly recognized as a metabolic disease, since patients display impaired brain glucose metabolism and insulin signaling (An et al., 2018; Arnold et al., 2018; Chatterjee et al., 2016). Peripheral metabolic impairments are also replicated in mouse models of AD neuropathology, which become aggravated following the induction of experimental diabetes (Gratuze et al., 2017b; Vandal et al., 2014b). RSCE extended over three weeks (15 sessions of 4-hour cold exposure) was sufficient to improve glucose tolerance in 16-month-old 3xTg-AD mice. Such a result is in agreement with several studies that found that cold acclimation improved glucose metabolism in rodents and humans (Hanssen et al., 2015b; T.-Y. Wang et al., 2015). Here, glucose intolerance in the 3xTg-AD mice was likely caused by AD neuropathology generated by the expression of transgenes in the CNS in combination with the westernized diet (Vandal et al., 2015b; 2014b). This indicates that BAT stimulation, a procedure with a long history in the field of metabolic diseases (de Souza and Burkey, 2001), could correct a peripheral metabolic endpoint consequent of central AD neuropathology.

### 1.6.3. RSCE protected against cold-induced tau phosphorylation

As a second key mechanism, BAT stimulation could exert a central therapeutic effect by preventing body temperature from dropping below the hypothermic threshold known to trigger tau hyperphosphorylation (Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016). Several studies in rodents have shown that tau phosphorylation is increased following a reduction in body temperature induced by different means, such as external cold exposure, anesthesia, hibernation or glucose deprivation (Arendt et al., 2003; Le Freche et al., 2012; Planel et al., 2009; 2004; Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016). Here, RSCE training before a 24-hour exposure to 4 °C completely blunted cold-induced tau phosphorylation in old 3xTg-AD mice. This indicates that an increased thermogenesis capacity confers full protection against this neuropathological insult. To the best of our knowledge, this is the first time that an intervention is shown to block an *in vivo* rise in cold-induced tau phosphorylation in the hippocampus, indicating an important link between thermoregulation and tau phosphorylation.

Although not all the studies found correlations between tau and cognition in humans, there is strong evidence that postmortem tau pathology correlates with antemortem memory deficits, and this association is usually stronger than with A $\beta$  (Arriagada et al., 1992; Bennett et al., 2004; Nelson et al., 2012; Robinson et al., 2011; Tremblay et al., 2017; 2007). The phospho-epitopes of tau protein assessed here, specifically pSer396/404

and pThr231, are important from an AD standpoint, as they correlate with clinical diagnoses and antemortem cognitive deficits, including episodic memory (Tremblay et al., 2017; 2007). Indeed, we previously observed a negative correlation between global cognitive score (including episodic memory) and both pThr231/Ser235 and pSer396/404 phosphorylated tau in the same series of clinically characterized volunteers from the Religious Order study, using extracts from the parietal cortex (Tremblay et al., 2017). These associations remained significant even after adjustment for total tau, highlighting the importance of soluble tau phosphorylation at these sites in AD cognitive impairment (Tremblay et al., 2017). In addition, the Ser396/404 epitope also correlates strongly with the spread of neurofibrillary tangles and Braak diagnosis (Tremblay et al., 2007). In vitro evidence indicates that these phospho-epitopes are also involved in the pathological aggregation of tau (Martin et al., 2011). Thus, it could be speculated that preventing hyperphosphorylation at those specific sites could prevent tau protein aggregation and its associated cognitive deficits.

Acute reductions in body temperature by various means, such as anesthesia, has been hypothesized to induce lasting deleterious rises in tau phosphorylation (Le Freche et al., 2012; Planel et al., 2009). Hypothermia and more frequent and pronounced fluctuations in body temperature during the day are observed in the elderly, notably in AD patients (Collins, 1995; Gomolin et al., 2005). We previously showed that old age potentiates cold-induced tau phosphorylation in mice (Tournissac et al., 2017). It is thus reasonable to think that tau phosphorylation fluctuates during the day along with body temperature, possibly leading to tau hyperphosphorylation and aggregation over the long term in older individuals. Here, RSCE over a four-week period did not increase insoluble tau phosphorylation, even if body temperature decreased during the first exposures (-0.5 to -1°C). This rather indicates that short exposures to cold do not induce tau aggregation, and that the stimulation of thermogenesis may counteract the adverse impact of transient reductions in body temperature.

Tau phosphorylation is regulated by the activity of various kinases and phosphatases. Although we did not find any change in PP2A levels in the hippocampus of RSCE-exposed mice, PP2A activity has been shown to be directly inhibited by low temperatures (Planel et al., 2004). Instead, GSK3 $\beta$  pSer9 followed a pattern very similar to tau phosphorylation, suggesting a possible involvement in the protection induced by RSCE. Such a view is consistent with the fact that this site of phosphorylation is sensitive to hypothermia (Bretteville et al., 2012).

#### 1.6.4. RSCE increased FGF21 production

Our data suggest that FGF21 could be a third potential therapeutic target linking increased BAT thermogenesis activity with a potential benefit in AD. The idea that FGF21 is of interest in AD is in agreement with previous work suggesting that this batokine protects against obesity-induced memory impairment and A $\beta$ 42 toxicity (Amiri et al., 2018; Sa-Nguanmoo et al., 2016b). While the fact that RSCE mice were completely protected from cold-induced tau phosphorylation is certainly linked to the increased ability of old mice to maintain their body temperature during a cold challenge, a direct BAT-to-brain crosstalk could be at least partly involved. Plasmatic levels of FGF21 were inversely correlated with tau phosphorylation in the hippocampus of 3xTg-AD mice, which support such a link but does not prove any causal relationship. Thus, further investigations on the effects of FGF21 in AD models, for example by directly administering recombinant FGF21 or drugs targeting the FGF21 receptor, would be of interest.

The present work does not confirm whether BAT training leads to improved cognitive faculties. The RSCE paradigm used here is not compatible with behavioral testing, as it is not possible to test the mice immediately after or during cold exposure. Indeed, locomotor activity and exploratory behavior are affected by cold exposure (Ishii et al., 1996; Jhaveri et al., 2007). Thus, mice will hardly perform as expected in most behavioral paradigms, introducing insurmountable biases. However, given the previously reported beneficial effects of RSCE on metabolic disorders, we opted to perform a glucose tolerance test during the few days without short cold exposure. Nevertheless, the effects observed in the present study following RSCE have been previously associated with cognitive-enhancing properties. Indeed, increased circulating FGF21 (Sa-Nguanmoo et al., 2016b) and better glucose homeostasis (Porter et al., 2011) are associated with improved cognitive performance in diabetic rodents.

#### 1.6.5. Conclusions

Overall, our results indicate for the first time that BAT thermogenesis stimulation through RSCE is efficient in old mice and results in improved glucose metabolism and protection against cold-induced tau hyperphosphorylation. Thus, therapeutic strategies aiming to stimulate BAT thermogenesis initially developed against metabolic disorders could be repurposed for dementia.

## **1.7. Acknowledgements**

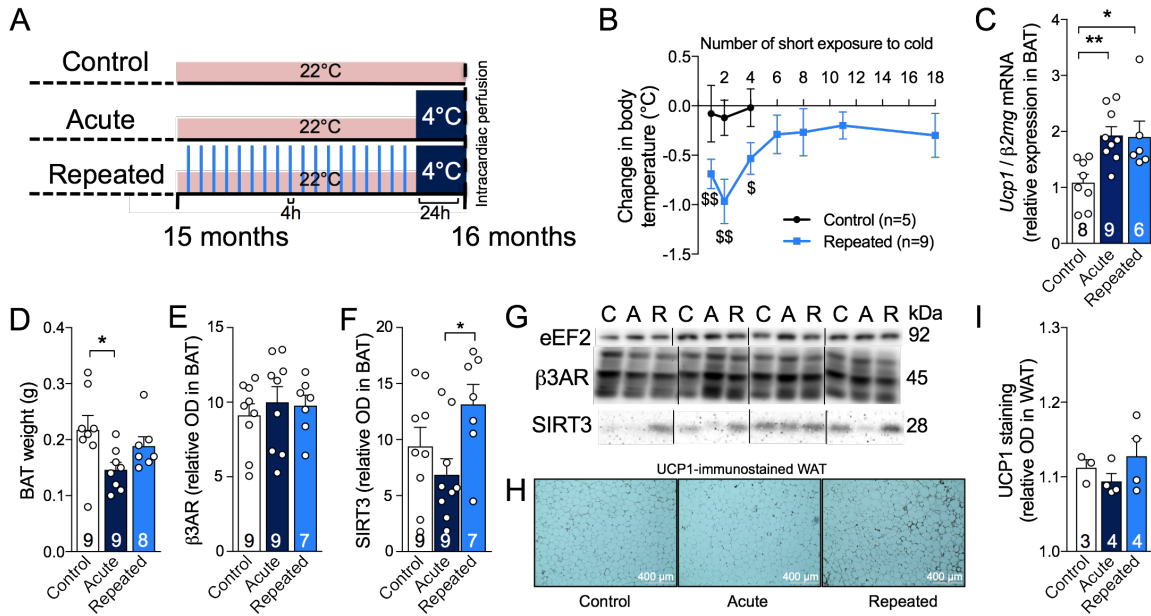
### **1.7.1. Author contributions**

M.T. developed the experimental design, performed animal experiments, protein extractions, western blots in the hippocampus, BAT and muscle, A $\beta$ , insulin, and FGF21 ELISAs, qPCR, UCP1 immunostaining, and triglycerides assays, completed the statistical analysis and wrote the first versions of the manuscript. P.B. contributed to animal experiments, protein extractions, western blots in the hippocampus and BAT, and A $\beta$  and corticosterone ELISAs and reviewed the manuscript. R.M. performed western blots in the hippocampus and contributed to the qPCR experiment and protein extractions. T.V. contributed to the UCP1 immunostaining, adipocytes quantification, and western blots in the muscle. E.P. provided expertise for the tau analysis and reviewed the manuscript. S.H. provided qPCR equipment and reviewed the manuscript. F.C. secured funding and contributed to the experimental design and wrote the manuscript. F.C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

### **1.7.2. Funding**

M.T. was funded by a scholarship from the Alzheimer Society of Canada. P.B. received a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research. This study was made possible by funding from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 102532), the Quebec Network for Research on Aging, the Alzheimer Society of Canada (#1502), and the Canadian Foundation for Innovation (#34480). F.C. and E.P. are a Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S) scholars (#253895, #26936, and #252178).

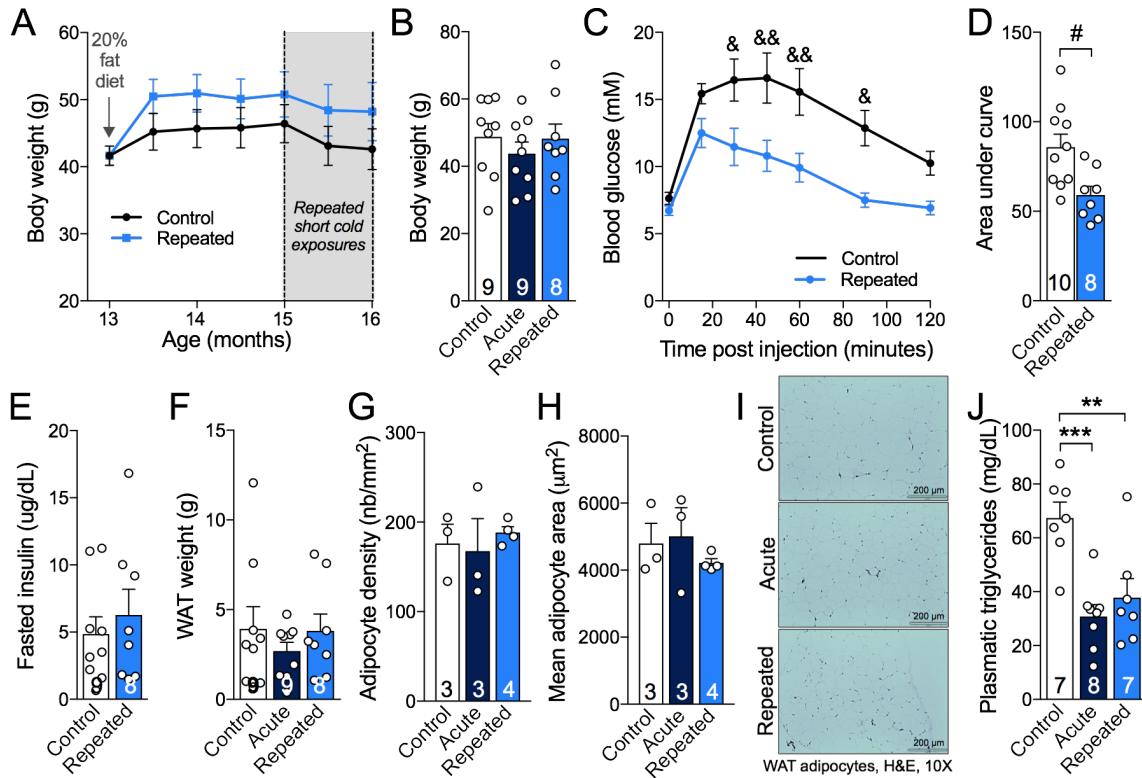
## 1.8. Figures



**Figure 2.1. Repeated short cold exposures protect old 3xTg-AD mice against cold-induced decrease in body temperature by increasing thermogenesis.**

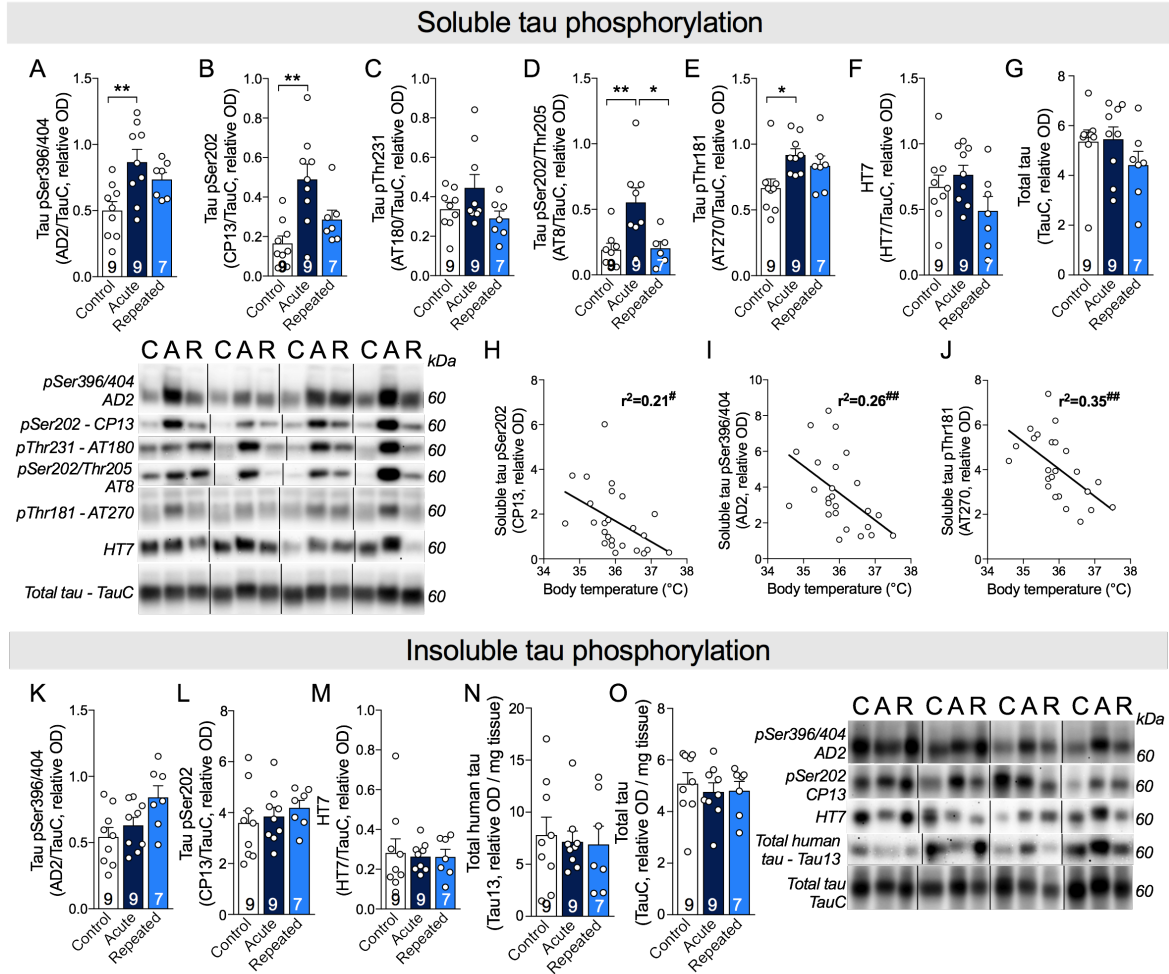
A: Study timeline, including RSCE. B: Difference in rectal temperatures of exposed and non-exposed mice taken before and after each short exposure to cold (4h, 4 °C) between 15 and 16 months of age. The temperature of the mice was recorded before and after the first, the second, the 4<sup>th</sup>, the 6<sup>th</sup>, the 8<sup>th</sup>, the 13<sup>th</sup> and the 18<sup>th</sup> (last) repeated short cold exposure (RSCE) (4 °C during 4 hours). C: BAT *Ucp1* mRNA expression normalized to  $\beta$ 2mg (qPCR). D: BAT weighed just after dissection. E: Levels of  $\beta$ 3AR and F: SIRT3 proteins measured in BAT by Western blot. G: Examples of Western Blots. Homogenates were all run on the same gel, but consecutive bands were not taken for all representative photo examples. H: Immunohistochemistry of UCP1 on WAT sections. I: Quantification of UCP1 staining in WAT. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in bars). Statistical analyses: One sample t-test versus 0: #p<0.05; ##p<0.01. One-way ANOVA, Tukey's post-hoc test: \*p<0.05; \*\*p<0.01. Control (C): 22 °C; Acute (A): 24h, 4 °C; Repeated (R): 4h, 4 °C for four weeks + 24h, 4 °C. Abbreviations:  $\beta$ 2mg:  $\beta$ 2 microglobulin;  $\beta$ 3AR:  $\beta$ 3 adrenergic receptor; BAT: brown adipose tissue; eEF2: eukaryotic elongation factor 2; Ucp1: uncoupling protein 1; SIRT3: Sirtuin 3; WAT: white adipose tissue.





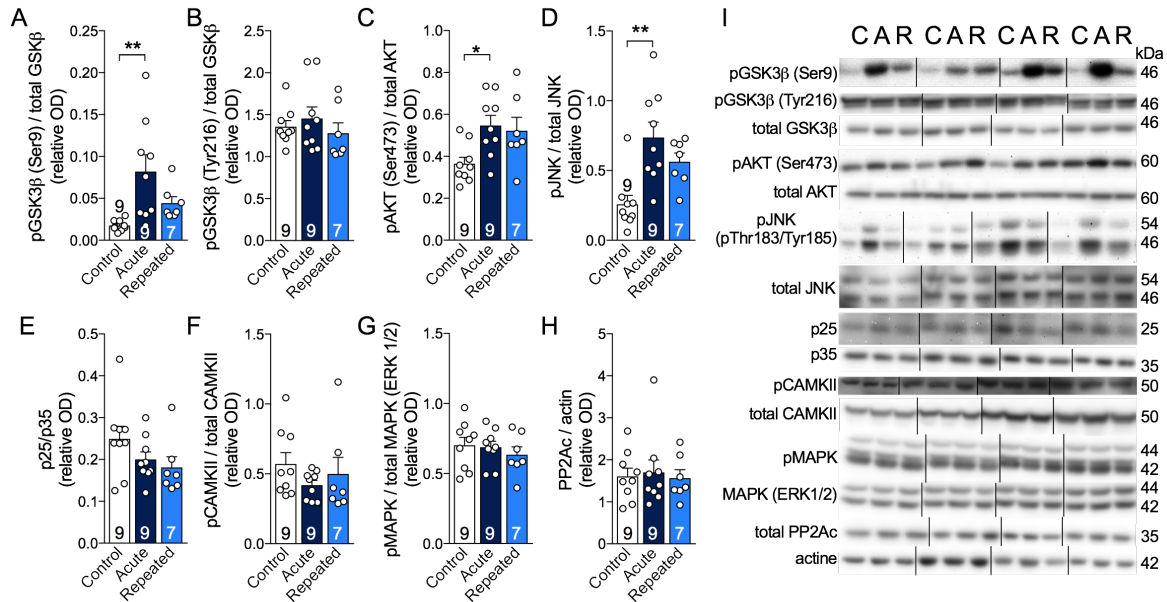
**Figure 2.2. Repeated short cold exposures improved glucose tolerance in 16-month-old 3xTg-AD mice and decrease plasmatic triglycerides without affecting white adipose depots.**

A: Body weights during the dietary treatment and series of repeated short cold exposures. B: Body weight at the end of the experiment. C,D: Glucose tolerance test performed after the fifteenth short cold exposure session. E: Levels of insulin measured in plasma sampled after the 6-hour fasting (before GTT). F: Visceral (epididymal and perirenal fat) and subcutaneous (inguinal) adipose tissue of 16-month-old 3xTg-AD mice weighed just after dissection. G,H: Number and average surface of adipocytes in epididymal fat. I: Photos of white adipocytes (H&E stained paraffin sections). J: Levels of triglycerides measured in plasma sampled at the sacrifice in non-fasted mice. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in bars). Statistical analyses: Repeated measures two-way ANOVA, Bonferroni's post-hoc test:  $\&p < 0.05$ ;  $\&\&p < 0.01$ . Unpaired Student t-test:  $\#p < 0.05$ . One-way ANOVA, Tukey's post-hoc test:  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ . Control: 22  $^{\circ}$ C; Acute: 24h, 4  $^{\circ}$ C; Repeated: 4h, 4  $^{\circ}$ C for four weeks + 24h, 4  $^{\circ}$ C. Note: "Control" and "Acute" groups were pooled under the "Control" group in A and C because at the time of the GTT and the weighing, "Acute" mice did not yet undergo the acute exposure to cold (24h, 4  $^{\circ}$ C) and were still in the same conditions as the "Control" group (22  $^{\circ}$ C).



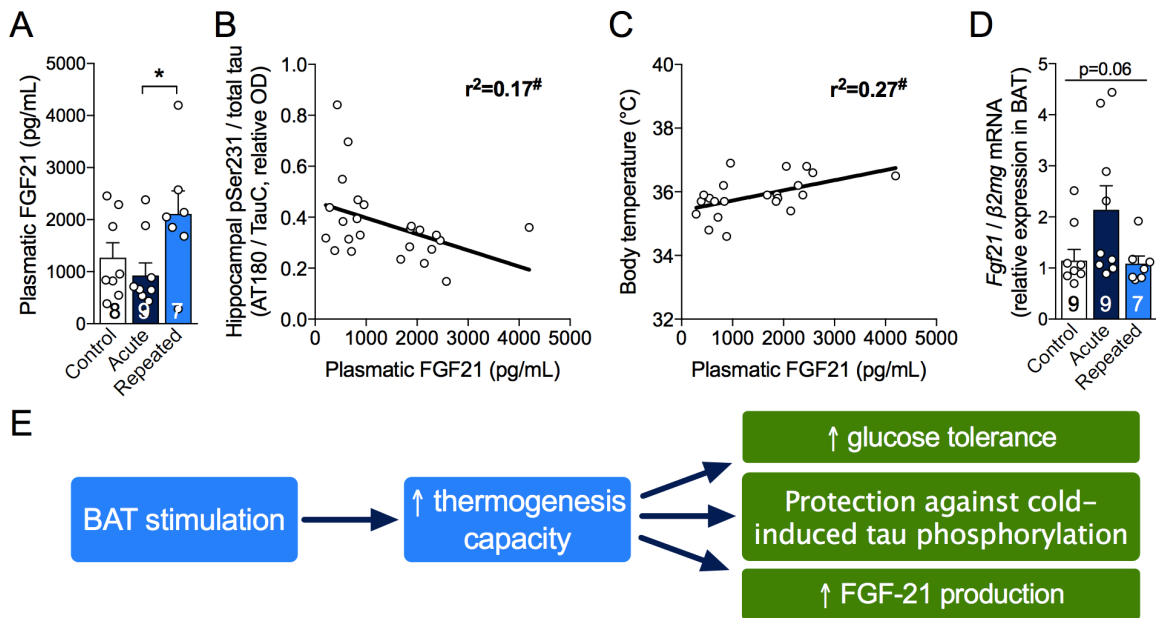
**Figure 2.3. Repeated short cold exposures protect old 3xTg-AD mice against cold-induced phosphorylation of soluble tau.**

A-G: Hippocampal soluble tau phosphorylation of 16-month-old 3xTg-AD mice. H-J: Correlations between hippocampal soluble tau phosphorylation and body temperature at sacrifice. K-O: Hippocampal insoluble tau phosphorylation. Homogenates were all run on the same gel, but consecutive bands were not taken for all representative photo examples. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in bars). Statistical analyses: One-way ANOVA, Tukey's post-hoc test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Pearson  $r$  correlation: # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ . Control (C): 22 °C; Acute (A): 24h, 4 °C; Repeated (R): 4h, 4 °C for four weeks + 24h, 4 °C.



**Figure 2.4. Repeated short cold exposures modify the levels of kinases involved in tau phosphorylation.**

A-I: Levels of kinases and phosphatase measured by Western blot in the hippocampus of 16-month-old 3xTg-AD mice. Homogenates were all run on the same gel, but consecutive bands were not taken for all representative photo examples. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in bars). Statistical analyses: One-way ANOVA, Tukey's post-hoc test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Control (C): 22  $^{\circ}$ C; Acute (A): 24h, 4  $^{\circ}$ C; Repeated (R): 4h, 4  $^{\circ}$ C for four weeks + 24h, 4  $^{\circ}$ C. Abbreviations: AKT: protein kinase B; CAMKII: calmodulin-dependent protein kinase II; GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; JNK: c-Jun N-terminal kinase; MAPK (ERK1/2): mitogen-activated protein kinase; p25/35: protein kinase 25/35; PP2Ac: protein phosphatase 2A, catalytic subunit.



**Figure 2.5. Repeated short cold exposures increase FGF21 production by BAT.**

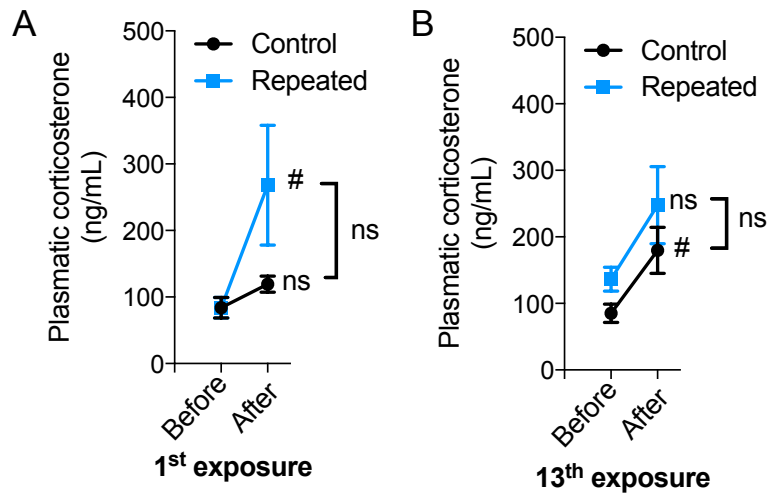
A: FGF21 levels measured by ELISA in plasma sampled just before intracardiac perfusion in non-fasted mice. B,C: Correlations between plasmatic FGF21 and hippocampal tau phosphorylation at Ser231 and body temperature at sacrifice. D: Ratio of *Fgf21* on *β2mg* gene expression in BAT measured by qPCR. E: Schema of key results. Data are represented as mean ± SEM (n/group indicated in bars). Statistical analyses: One-way ANOVA, Tukey's post-test: \* $p < 0.05$ . Pearson r correlation: # $p < 0.05$ . Control: 22 °C; Acute: 24h, 4 °C; Repeated; 4h, 4 °C for four weeks + 24h, 4 °C.

## 1.9. Supplementary data

<b>Diet composition</b>	
<b>General information (kcal%)</b>	
Protein	21.0
Fat	39.0
Carbohydrate	40.0
Total	100
(kcal/g)	4.6
<b>Ingredients (% w/w)</b>	
Casein	200
DL-Methionine	3
Corn starch	75
Maltodextrine 10	75
Sucrose	223
Cellulose, BW200	50
Safflower oil	40
Butter, anhydrous	92
Lard	41
Ethoxyquin	0.001
Mineral mix S19101	35
Sodium selenite (45,7% Se)	0.00028
Vitamin mix V15908	10
Choline bitartrate	2
Cholesterol, USP	1.5
<b>Fatty acid content (g/kg) †</b>	
C16:0	41.0
C18:0	11.6
C20:0	0.3
C22:0	0.2
SFA	67.5
MUFA	48.1
C18:1 n-9 (OA)	42.3
C18:2 n-6 (LA)	48.2
C20:4 n-6 (AA)	0.2
C22:4 n-6 (DTA)	0.1
C22:5 n-3 (DPA)	0.1
C18:3 n-3 (LNA)	1.6
C20:5 n-3 (EPA)	0
C22:6 n-3 (DHA)	0
n-6 PUFA	48.7
n-3 PUFA	1.7
total PUFA	50.4
n-6:n-3 ratio	28.6

**Supplementary Table 2.1. Composition of the “Western” diet.**

AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; DTA, docosatetraenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; LA, linoleic acid; LNA, linolenic acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; OA, oleic acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid. †Measured by gas chromatography.



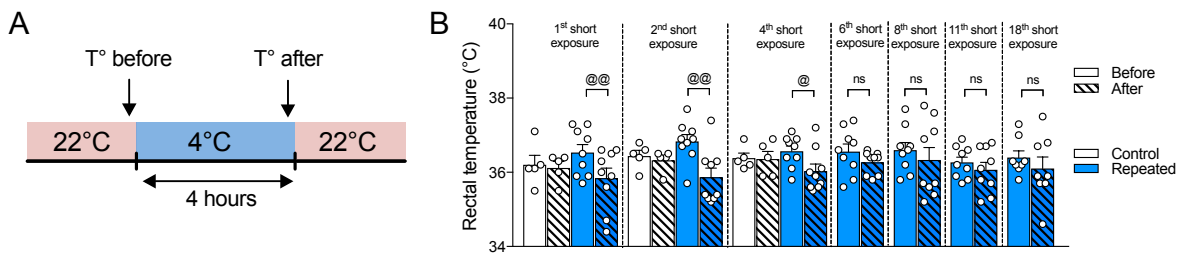
**Supplementary Figure 2.1. No difference between cold-exposed and non-exposed mice on change in plasmatic corticosterone levels.**

Plasmatic corticosterone measured by ELISA in blood sampled before and after the first (A) and the thirteenth (B) 4-hour exposure at 4 °C in non-fasted mice. All the animals were moved from their housing room (22 °C) to the room next to the cold chamber to ensure equal stress between groups just before the exposure. Data are represented as mean ± SEM. n/group: 4-6. Statistical analyses: Paired t-test: #  $p < 0.05$  (before versus after); Unpaired Student t-test: not significant (ns, control versus repeated). Control: 22 °C; Repeated; 4h, 4 °C for four weeks + 24h, 4 °C.

	Control (n=9)			Acute (n=9)			Repeated (n=8)			P-value
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	
<b>Sarcolipin</b>	48,8	±	18,2	53,4	±	16,6	50,1	±	12,0	ns
<b>Serca1</b>	77,9	±	8,3	79,6	±	11,0	81,3	±	10,8	ns
<b>Serca2</b>	60,4	±	13,0	62,4	±	13,1	58,2	±	7,6	ns
<b>GLUT4</b>	40,0	±	11,9	50,6	±	15,8	41,8	±	16,9	ns
<b>Pgc1-<math>\alpha</math></b>	1,8	±	1,1	2,2	±	1,2	1,8	±	0,8	ns

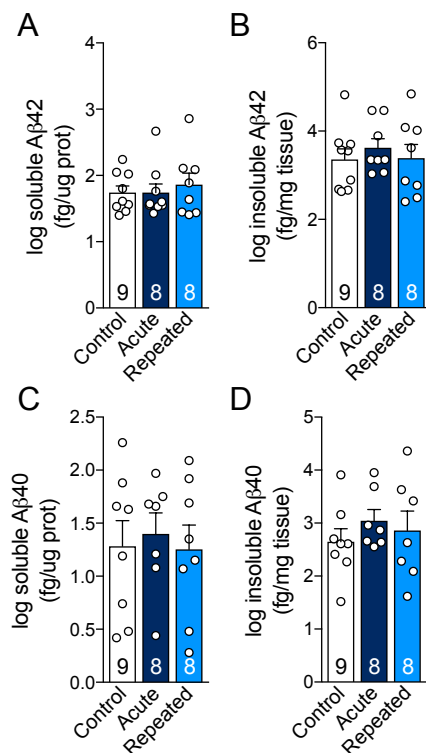
**Supplementary Table 2.2. Quantification of the optical density of proteins detected by Western Blot in gastrocnemius muscles homogenates.**

Control: 22 °C; Repeated; 4h, 4 °C for four weeks + 24h, 4 °C.



**Supplementary Figure 2.2. Change in body temperature before and after each short cold exposure (raw data of Fig.1B).**

A: Description of the timeline for body temperature collection for each short cold exposure (4h, 4 °C). B: Rectal temperatures of exposed (Repeated) and non-exposed (Control) mice taken before and after short exposures to cold (4h, 4 °C) at 16 months. Paired t-test: @p<0.05; @@p<0.01.



**Supplementary Figure 2.3. Cortical levels of amyloid peptides were not affected by repeated short cold exposures.**

Levels of soluble and insoluble A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides measured by ELISA in the parieto-temporal cortex of 16-month-old 3xTg-AD mice. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Control: 22 °C; Repeated; 4h, 4 °C for four weeks + 24h, 4 °C.

	Control			Acute			Repeated		
	Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD
<b>Synaptic proteins</b>									
Drebrin	2078	$\pm$	938	2159	$\pm$	887	1886	$\pm$	627
PSD95	4034	$\pm$	1497	4017	$\pm$	1352	4314	$\pm$	773
SNAP25	639	$\pm$	236	747	$\pm$	258	830	$\pm$	157
Synaptophysin	3476	$\pm$	1079	3687	$\pm$	912	3640	$\pm$	817
<b>Other</b>									
Bax / Bcl-2	1,034	$\pm$	0,157	1,022	$\pm$	0,112	0,964	$\pm$	0,123
GFAP	5204	$\pm$	872	5478	$\pm$	1272	5151	$\pm$	1189
GLUT1 55 kDa	3584	$\pm$	1156	4411	$\pm$	1273	4323	$\pm$	1643
GLUT1 45 kDa	7806	$\pm$	2350	8625	$\pm$	2108	8755	$\pm$	2743
GLUT4	3156	$\pm$	1313	3323	$\pm$	1516	3300	$\pm$	1381



**Supplementary Table 2.3. Synaptic proteins and other markers are not affected by repeated cold exposures.**

Data are expressed as relative optical densities. Bax: Bcl-2 associated X protein; GFAP: glial fibrillary acidic protein; PSD95: postsynaptic density protein 95; SNAP25: synaptosomal-associated protein 25.

Antibody	Clone	Specificity	Host	Source
<b>Primary antibodies</b>				
<b>Actin</b>	monoclonal	$\beta$ -actin	Mouse	Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada)
<b>AKT</b>	polyclonal	AKT a.a. 345-480	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
<b>AKT (phospho)</b>	polyclonal	AKT, phosphorylated at Ser-473	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b><math>\beta</math>3AR</b>	polyclonal	Mouse beta 3 adrenergic receptor, aa 350 to C-terminus	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
<b>CAMKII</b>	6G9	CAMK2 alpha subunit (alpha, beta and gamma isoforms)	Mouse	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>CAMKII (phospho)</b>	polyclonal	CAMK2, phosphorylated at Thr-286	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>Cdk5</b>	polyclonal	peptide mapping at the C-terminus of Cdk5 of human origin	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
<b>Drebrin</b>	Mx823	c-term peptide (a.a.632-649)	Mouse	Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany)
<b>eEF2</b>	polyclonal	total eEF2 protein independant of phosphorylation	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>GFAP</b>	GA-5	GFAP	Mouse	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
<b>GLUT4</b>	polyclonal	C-terminus	Rabbit	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	monoclonal	Rat GSK-3 $\beta$ aa. 1-160	Mouse	BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada)
<b>GSK3<math>\beta</math> (phospho)</b>	polyclonal	GSK3 $\beta$ , phosphorylated at Ser-9	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>GSK3<math>\beta</math> (phospho)</b>	polyclonal	GSK3 $\beta$ , phosphorylated at Tyr-216	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>JNK</b>	polyclonal	Whole SAPK/JNK protein	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>JNK (phospho)</b>	polyclonal	p46/p54 SAPK/JNK, phosphorylated at Thr-183 and Tyr 185	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>ERK</b>	polyclonal	Whole p44/42 MAPK (Erk1/Erk2)	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>ERK (phospho)</b>	polyclonal	MAPK, phosphorylated at Thr-202 and Tyr-204 of Erk1 and Thr-185 and Tyr-187 of Erk2	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>p35/25 (C64B10)</b>	polyclonal	C-terminus of p35	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>PGC1-<math>\alpha</math></b>	polyclonal	aa 777-797 (c-terminus)	Rabbit	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
<b>PP2AC</b>	polyclonal	PP2A catalytic subunit ( $\alpha$ and $\beta$ isoforms)	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>PSD95</b>	monoclonal	aa 77-299	Mouse	NeuroMab (Davis, CA, USA)
<b>Sarcophilin</b>	polyclonal	c-terminus of sarcophilin protein	Rabbit	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
<b>Serca1</b>	polyclonal	Internal sequence of SERCA1 ATPase	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
<b>Serca2</b>	polyclonal	Residues 1-100 of SERCA2 ATPase	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
<b>SIRT3</b>	monoclonal	total SIRT3 protein	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
<b>SNAP25</b>	SM1 81	Whole Snap25	Mouse	Covance, Inc. (Princeton, NJ, USA)
<b>Synaptophysin</b>	monoclonal	Synaptophysin	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
<b>Tau (total) TauC</b>	polyclonal	C-terminal region of tau protein	Rabbit	Dako (Burlington, ON, Canada)
<b>Tau (total)</b>	Tau13	Human total tau	Rabbit	Dako (Burlington, ON, Canada)
<b>Tau (normal Tau and PHF-tau)</b>	HT7	aa 159-163	Mouse	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
<b>Tau (phospho)</b>	AT8	Tau, phosphorylated at Ser-202 and Thr-205	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
<b>Tau (phospho)</b>	AT180	Tau, phosphorylated at Thr-231	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
<b>Tau (phospho)</b>	AT270	Tau, phosphorylated at Thr-181	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
<b>Tau (phospho)</b>	CP13	Tau, phosphorylated at Ser-202	Mouse	Generous gift from Peter Davies
<b>Tau (phospho)</b>	AD2	Tau, phosphorylated at Ser-396 and Ser-404	Mouse	BioRad (Hercules, CA, USA)
<b>Secondary antibodies</b>				
<b>Goat anti-mouse</b>		Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG (H+L)	Goat	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
<b>Goat anti-rabbit</b>		Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L)	Goat	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)

**Supplementary Table 2.4. Antibodies used in the study.**

**Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.**

# **A beta3-adrenergic receptor agonist reverses memory deficits and reduces insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in a mouse model of Alzheimer's disease**

Marine Tournissac<sup>1,2</sup>; Nika Vrabic<sup>2</sup>; Tra-My Vu<sup>1,2</sup>; Clara Hozer<sup>3</sup>; Cyntia Tremblay<sup>2</sup>, Emmanuel Planel<sup>2,4</sup>, Fabien Pifferi<sup>3</sup>, Frédéric Calon<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Axe Neurosciences, Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Qc, Canada;

<sup>3</sup>UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France.

<sup>4</sup>Département de psychiatrie et neurosciences, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

## 1.1. Résumé

L'âge avancé, principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (MA), est associé à des déficits de thermorégulation. L'acclimatation au froid protège les souris 3xTg-AD de l'hyperphosphorylation de tau induite par l'hypothermie. Ainsi, la stimulation du tissu adipeux brun (TAB) par un agoniste des récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques ( $R\beta_3A$ ) pourrait être bénéfique pour la MA. Des souris 3xTg-AD et non-transgéniques âgées ont reçu le CL-316,243 ou du salin pendant un mois. Le CL-316,243 a diminué le poids, amélioré le métabolisme du glucose périphérique et a augmenté la thermogenèse du TAB chez les souris de 16 mois. Le traitement a augmenté de 19% l'index de reconnaissance des 3xTg-AD par rapport au score avant le traitement. Enfin, le ratio d'A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 insolubles a été réduit de 27% dans l'hippocampe des 3xTg-AD ayant reçu le CL-316,243. Les agonistes des  $R\beta_3A$ , dont l'un est utilisé en clinique, pourraient représenter de nouveaux outils thérapeutiques pour la MA.

## 1.2. Abstract

Old age, the most important risk factor for Alzheimer's disease (AD), is associated with thermoregulatory deficits. Brown adipose tissue (BAT) is the main thermogenic driver in mammals and its stimulation, through  $\beta_3$ -adrenergic receptor ( $\beta_3AR$ ) agonists or cold acclimation, counteracts metabolic deficits in rodents and humans. Studies in animal models show that AD neuropathology leads to thermoregulatory deficits and cold-induced tau hyperphosphorylation is prevented by cold acclimation. Since metabolic disorders and AD share strong pathogenic links, we hypothesized that BAT stimulation through  $\beta_3AR$  agonist could exert benefits in AD as well. Non-transgenic and 3xTg-AD mice of 15 months received a  $\beta_3AR$  agonist (CL-316,243, 1 mg/kg/day i.p.) or saline for a month. We first confirmed that  $\beta_3AR$  agonist administration decreases body weight and improved peripheral glucose metabolism in both non-transgenic and 3xTg-AD mice.  $\beta_3AR$  stimulation increased BAT thermogenesis as shown by higher uncoupling protein 1 and mitochondrial oxidative phosphorylation complex levels in BAT. Novel object recognition was performed before (14 months) and after (16 months) the treatment. One-month treatment with a  $\beta_3AR$  agonist increased recognition index (RI) by 19% in 3xTg-AD mice compared to pre-treatment. Locomotion, anxiety and tau pathology were not modified. Finally, insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio was decreased by 27% in the hippocampus of CL-316,243-injected 3xTg-AD mice. Overall, our results indicate that  $\beta_3AR$  stimulation reverses memory deficits and shifts

downward the insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in 16-month-old 3xTg-AD mice.  $\beta$ 3AR agonists, of which one is currently used in clinic, could represent a valuable therapeutic strategy in AD.

### **1.3. Introduction**

Old age is the main risk factor of Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder clinically expressed by memory deficits and cognitive dysfunction (Querfurth and LaFerla, 2010; Scheltens et al., 2016). The prevalence of AD is growing fast along with the aging population (Winblad et al., 2016). Yet, the exact pathogenic causes of the sporadic form of the disease are unknown. Despite decades of intense research and clinical trials, there is still no curative treatment for AD. Since AD is a complex and multifactorial disease, with frequent age-related comorbidities, multi-target agents might be advantageous over a single-bullet approach. The undeniable impact of old age on AD incidence indicates that aging triggers etiopathological factors of AD; identifying these key factors could provide invaluable clues to the development of novel therapeutic treatments.

Thermoregulation deficits are another documented consequence of old age. Although few studies investigated thermoregulation in AD individuals, it is well known that thermoregulatory deficits appear in the elderly, the population primarily affected by AD (Degroot and Kenney, 2007; Gomolin et al., 2005; Grassi et al., 2003; Hebert et al., 2013). Mounting evidence now supports the hypothesis that thermoregulation deficits contribute to the development of AD pathology. Spontaneous thermoregulation deficits occur in AD mouse models, including the 3xTg-AD mice (Huitrón-Reséndiz et al., 2002; Knight et al., 2013; Sterniczuk et al., 2010; Vandal et al., 2016). Studies in mouse and hibernators repeatedly showed that decreased body temperature leads to increased tau phosphorylation (Arendt et al., 2003; Planel et al., 2007; Stieler et al., 2011). Accordingly, manipulation of external temperature leads to strong modulation of AD neuropathology in mice: cold exposure increases tau phosphorylation and amyloid pathology and decreases synaptic proteins, while higher temperature reverses memory and anxiety-like behavior and reduced amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 42 peptides in 3xTg-AD mice (Vandal et al., 2016). More recently, our group provided evidence that enhancement of thermogenesis through cold acclimation improves metabolic disorders and protects old 3xTg-AD mice from cold-induced tau phosphorylation (Tournissac et al., 2019). Supporting the link with age, we showed that cold-induced tau phosphorylation is potentiated in old mice compared to young mice (Tournissac et al., 2017). Altogether, these observations suggest that thermoregulatory mechanisms could be a potential therapeutic target in AD.

Beside thermoregulation, metabolic diseases share strong pathogenic links with AD and have been raising interest in the field of AD. Indeed, induction of a diabetic phenotype in mice model of AD, such as glucose intolerance, has been repeatedly shown to increase AD neuropathology (Gratuze et al., 2017b; Julien et al., 2010; Theriault et al., 2016; Vandal et al., 2014b). Central insulin signaling defects and lower brain glucose metabolism are observed in AD (An et al., 2018; Arnold et al., 2018). It is estimated that one out of ten cases of AD is attributable to type 2 diabetes (T2D) (Biessels et al., 2006). These observations logically led to the idea of repurposing T2D drugs in AD (Yarchoan and Arnold, 2014). Insulin, thiazolidinediones and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog are still the subject of clinical trials in dementia, with mitigated results (Craft et al., 2012; Gejl et al., 2016; J. Liu et al., 2015). Thus, common metabolic targets between both diseases such as thermoregulatory defects are of interest to develop new therapeutic tools.

Brown adipose tissue (BAT) is the main thermogenic driver in mammals (Cannon and Nedergaard, 2004). The discovery of functional BAT in adults in 2009 has incredibly revived researches in this tissue (Cypess et al., 2009; Virtanen et al., 2009). The ability of BAT thermogenesis to improve main metabolic disorders is now well-established, even in old mice (Hanssen et al., 2015b; Ravussin et al., 2014; Schrauwen and van Marken Lichtenbelt, 2016; Tournissac et al., 2019). Pharmacological tools have been developed in this direction. In particular,  $\beta$ 3-adrenergic receptors ( $\beta$ 3AR) agonists are extensively used since  $\beta$ 3AR are mainly present in brown adipocytes and their stimulation leads to lipolysis and UCP1 expression, the main marker of non-shivering thermogenesis (Arch, 2011; Nedergaard et al., 2001). CL-316,243 is a highly specific  $\beta$ 3AR agonist frequently used in metabolic diseases studies in rodents. It has been shown to improve blood glucose metabolism, insulin sensitivity, energy expenditure and to regulate lipids metabolism (Burkey et al., 2000; de Souza et al., 1997; Kim et al., 2006; A. Kumar et al., 2015; Labbé et al., 2016). Since  $\beta$ 3AR agonists can correct metabolic disorders by enhancing BAT activity, they could tackle both T2D and AD at the same time. Importantly,  $\beta$ 3AR agonists are able to stimulate BAT activity in humans (Baskin et al., 2018; Cypess et al., 2015), and one (Mirabegron®) is presently in clinical use for overactive bladder (Chapple et al., 2014a). Therefore,  $\beta$ 3AR agonists could rapidly be tested in human for dementia.

We hypothesized that pharmacological stimulation of BAT thermogenesis through  $\beta$ 3AR agonist treatment could stem AD neuropathology and behavior through improved thermoregulatory and metabolic deficits. To verify whether  $\beta$ 3AR agonists could be novel therapeutic tools in AD, 15-month-old non-transgenic and 3xTg-AD mice received daily CL-316,243 (1 mg/kg) or saline injections for a month.

## 1.4. Methods

### 1.4.1. Animals

The triple-transgenic mouse model of AD (homozygous 3xTg-AD; APP<sub>swE</sub>, PS1<sub>M146V</sub>, tau<sub>P301L</sub>) developing both amyloid and tau pathology in the brain while aging was used here (Oddo et al., 2003b). We selected 15-month-old 3xTg-AD and non-transgenic (NonTg) littermates, at an age when 3xTg-AD mice have extended plaques and tangles in the brain, as well as cognitive deficits (Belfiore et al., 2018; Bories et al., 2012; St-Amour et al., 2014; Vandal et al., 2015b). Animals were all on the same genetic background (C57BL6/129SvJ) and were produced at our animal facility. 42 mice were used for all experiments (n= 9-12 mice per group), and 9 mice were added for behavioral and glucose tolerance tests for a total of 51 mice (n= 9-16 mice per group). Mice were housed one to five per cage at a housing temperature of 23°C, with a 12:12 hours light-dark cycle (light phase from 7 a.m. to 7 p.m). Animals had ad libitum access to water and chow (Teklad 2018, Harlan Laboratories, Canada). Only males were used here to avoid temperature variation induced by the estrous cycle of female mice (Weinert et al., 2004). Food consumption was evaluated by weighing the diet of each cage and averaged for each mouse per day per cage every four days during the one-month treatment, and three weeks before the beginning of the experiment. At the end of the experiment, all mice were put under deep anesthesia with ketamine/xylazine intraperitoneal (i.p.) injection (100 mg/kg ketamine, 10 mg/kg xylazine) and immediately placed under a heating pad to maintain body temperature until complete loss of posterior paw reflex. Then, mice were rapidly sacrificed by intracardiac perfusion with 0.1M phosphate buffer saline (PBS) solution containing phosphatases (sodium pyrophosphate, 1 mM and sodium fluoride, 50 mM) and proteases (Sigmafast protease inhibitor tablets, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) inhibitors. All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Institutional Committee of the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL).

### 1.4.2. CL-316,243 treatment

CL-316,243 was selected to stimulate BAT thermogenesis because it is one of the most selective  $\beta$ 3AR agonists in rodents ( $\beta$ 1:  $\beta$ 2:  $\beta$ 3 = 0:1:100,000) and its safety and efficacy has been confirmed in multiple studies (J. D. Bloom et al., 1992; Caron et al., 2017; Danysz et al., 2018; Ghorbani et al., 2012; Yoshida et al., 1994). Two to three weeks of daily injection at a dose of 1 mg/kg per day are necessary to improve metabolic disorders (Burkey et al., 2000; de Souza et al., 1997; Kim et al., 2006; A. Kumar et al., 2015; Labbé et al., 2016). Thus, mice were injected i.p. every day for a month with a weight-adjusted bolus of CL-316,243 (1

mg/kg) or an equivalent volume of saline (the vehicle) at the same hour of the day (4 p.m.) from 15 to 16 months of age (Fig. 3.1A). Mice were weighed every day before each i.p. injection.

#### 1.4.3. Body temperature measurement and analysis

Telemetric probes (Anipill, Caen, France) were used to record body temperature of the animals every hour during the one-month experiment without manipulation. Probes were implanted in the intraperitoneal cavity under isoflurane anesthesia a week before the beginning of the treatment to allow recovery from the surgery (Fig. 3.1A). Heat pads were used throughout the procedure to avoid hypothermia. The time under anesthesia was similar between mice and lasted approximately 10 minutes. Then, the animals were kept under heat pads during the waking period. Body temperature was analyzed during the two first weeks of treatment, before animals underwent glucose tolerance and behavioral tests, to avoid resulting interference in circadian rhythms. In order to visualize endogenous rhythmicity and regularity of the mice circadian clock, Clocklab software (Actimetrics Inc., Evanston, Illinois, USA) provided following parameters for each individual: mean body temperature during the dark phase (from 7 p.m. to 7 a.m.) and the light phase (from 7 a.m. to 7 p.m.), mean temperature amplitude during the dark and light phase and during a complete day.

#### 1.4.4. Glucose tolerance test

Glucose tolerance test (GTT) was performed at the end of the third week of treatment (Fig. 3.1A) (Vandal et al., 2015b). Mice were fasted for 6 hours (from 8 a.m. to 2 p.m.). Then, glucose was injected i.p. at 1 g/kg and blood glucose was measured regularly during 2 hours with a glucometer (OneTouch UltraMini; LifeScan, Milpitas, CA) in a blood drop sampled from the saphenous vein.

#### 1.4.5. Behavioral tests

Behavioral tests were performed during the fourth week of treatment with a recovery time of at least 24 hours between tests (Fig. 3.1A). The novel object recognition (NOR) test was also performed three weeks before the beginning of the treatment (baseline). Mice were acclimated overnight to the testing room located next to the housing room. Locomotor activity was assessed with the open field test (Dal-Pan et al., 2016). Mice were placed in a 40 cm x 40 cm x 40 cm translucent Plexiglas box for an hour. Movements were tracked with photobeam breaks (San Diego Instruments). The total distance traveled (voluntary horizontal movement) and the average speed were compared between groups. Anxiety behavior was evaluated with the dark-light box



test (Vandal et al., 2016). Mice were put in the center of the dark compartment with an opening to the light compartment. The time spent in the light compartment and the latency to do the first exploration (nose latency) of the light compartment were measured during a 5-minute trial. Memory deficits were evaluated with the NOR test. That test detects behavioral deficits from 12 months in 3xTg-AD mice and is one of the less stressful behavioral test (Arsenault et al., 2011; Clinton et al., 2007; St-Amour et al., 2014; Vandal et al., 2016). It evaluates recognition memory and corresponds to episodic memory that is early affected in AD (Antunes and Biala, 2012; Leger et al., 2013; Wolf et al., 2016). Mice were first placed in a 29.2 cm x 19 cm x 12.7 cm cage with two identical objects for 5 minutes during the acquisition phase. After an hour in their housing cage, mice returned in the testing cage containing a familiar and a novel object for the test phase. Recognition index (RI) corresponds to the time spent exploring the novel object divided by the total time of exploration during the test phase multiplied by 100. A 50% RI corresponds to an equal exploration between the novel and the familiar object. Mice exploring less than 6 seconds each object during the acquisition phase or less than 4 seconds during the test phase were excluded from the RI analysis. Mice were assigned to the treated or control group at 15 months of age with caution to homogenize memory performance (baseline RI) between groups at the beginning of the experiment.

#### 1.4.6. Tissue preparation for postmortem analysis

Intracardiac blood sampled just before intracardiac perfusion was centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes, and resulting plasma kept frozen at -80°C until analysis. The first hemisphere of all the mice and interscapular BAT were rapidly dissected and frozen at -80°C until processing. The second hemisphere was either fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours, and then transferred in a 20% sucrose solution until sectioning (3-4 mice per group) or frozen and kept at -80°C.

#### 1.4.7. Protein extractions

For the hippocampus, frozen samples were homogenized in 8 volumes of a lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Bimake, Houston, TX), sonicated (3 x 45 s in a Sonic Dismembrator apparatus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and centrifuged (100,000g, 20 min, 4°C), resulting in a detergent-soluble fraction (cytosolic, extracellular and membrane-bound proteins). The remaining pellets from ultracentrifugation were resuspended in formic acid, resulting in a detergent-insoluble fraction (insoluble proteins fraction). The resultant suspension was sonicated and centrifuged (13,000g, 20 min, 4°C), acid formic

was evaporated and proteins were either solubilized in Laemmli's buffer for Western blot or in a 5 M guanidium solution in Tris-HCl 50mM for A $\beta$  peptides ELISAs as previously described (Tremblay et al., 2007). Proteins from the BAT were extracted in the lysis buffer only. Protein concentrations were evaluated with a bicinchoninic acid assay (BCA, Pierce, Rockford, IL, USA).

#### 1.4.8. Western immunoblotting

15  $\mu$ g and 10  $\mu$ g of proteins of hippocampus and BAT homogenates, respectively, were loaded and separated by SDS-PAGE as previously described (Vandal et al., 2014b). The list of antibodies used in this study is available in Table S2. Homogenates were all run on the same gel for each experiment.

#### 1.4.9. A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides quantification

A $\beta$  peptides were quantified in protein extracts from the hippocampus. A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 were measured in detergent-soluble and detergent-insoluble fractions using a human  $\beta$ -amyloid ELISA (Wako, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions. Plates were read at 450 nm using a Synergy<sup>TM</sup> HT multi-detection microplate reader (Biotek, Winooski, VT).

#### 1.4.10. Immunohistochemistry

Amyloid plaques load was performed with MOAB-2 antibody. Briefly, hemispheres were post-fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and then transferred into a 20% sucrose solution. Hemispheres were cut in 25- $\mu$ m sections and stained as previously described (St-Amour et al., 2014).

#### 1.4.11. Statistical analysis

Data are represented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis and the number of samples per group are specified in each figure and legend. Bartlett's tests were used to rule out the inequality of variances between the groups. Two-way ANOVA (two independent variables: genotype and treatment) was used when all groups were compared in case of equal variances. In case of unequal variances, a Kruskal-Wallis followed by a Dunn's post-hoc test was performed. Repeated measures two-way ANOVA was executed to compare recurrent measurements in same animals. ANOVAs were followed by Tukey's post-hoc analysis.

An unpaired Student's t-test was performed when only two groups were compared with independent variables, with a Welch correction in case of unequal variances, and a paired t-test was executed for the comparison of two dependent variables. One sample t-test was used to compare means to a theoretical value (for the NOR test). Correlations between variables were investigated using linear regression analyses. All statistical analyses were performed with Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) or JMP (version 13.2.0; SAS Institute Inc., Cary, IL, USA) software and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 1.5. Results

### 1.5.1. $\beta$ 3AR stimulation improves peripheral glucose metabolism in old mice.

NonTg and 3xTg-AD mice received saline or CL-316,243 i.p. at a dose of 1 mg/kg every day for a month from 15 to 16 months of age (Fig. 3.1A). To verify whether CL-316,243 affects energy balance, mice were weighed every day before each i.p. injection and food consumption was evaluated three weeks before the beginning of the experiment and then every four days during the one-month treatment. First, we found that CL-316,243 injections induced persisting weight loss in both NonTg and 3xTg-AD mice (Fig. 3.1B,C). At the beginning of the experiment, food consumption recorded in the preceding 21 days was higher in 3xTg-AD compared to NonTg mice (average of 4.7 g/day/mice for 3xTg-AD versus 3.9 g/day/mice for NonTg mice; unpaired t-test with Welch's correction:  $p = 0.0105$ ) (Fig. 3.1D). Over the one-month period,  $\beta$ 3AR stimulation increased food consumption in NonTg mice up to levels of transgenic mice (Fig. 3.1D,E).

Previous studies showed improved glucose metabolism with CL-316,243 administration even in mice displaying a normal response to glucose (Xiao et al., 2015). Here, the GTT revealed that treated mice displayed a stronger control over glucose levels compared to control, independently of the genotype (Fig. 3.1F,G). Fasting blood glucose was also lower following three weeks of CL-316,243 administration (Fig. 3.1H). However, levels of plasmatic triglycerides were unchanged (Fig. 3.1I). Overall, our data indicate that  $\beta$ 3AR stimulation led to an improved pattern of metabolic determinants in the periphery in both NonTg and 3xTg-AD mice.

### 1.5.2. $\beta$ 3AR stimulation increases brown adipose tissue thermogenesis.

A telemetric probe implanted a week before the beginning of the treatment revealed daily variation in body temperature reaching its lowest point during the day and its peak during the night, as expected in the mouse (Fig. 3.2A). The amplitude of variation in body temperature were wider by 0.4°C in 3xTg-AD than in NonTg mice during both 12-h light and 12-h dark phases (Fig. 3.2A-C), consistent with thermoregulation defects previously reported in the same model (Vandal et al., 2016). CL-316,243 treatment further increased the amplitudes during the light phase (from 7 a.m. to 7 p.m.) (Fig. 3.1B), corresponding to the injection time, but not during the dark phase (Fig. 3.1C). This was confirmed by higher body temperature lasting few hours after the first injection of CL-316,243, as measured by the area under curve of the body temperature calculated between the 4 p.m. injection and 12 p.m. (Fig. 3.1D,E).

Since CL-316,243 is well known to improve thermogenesis capacity in mice (Labbé et al., 2016; Poher et al., 2015; Xiao et al., 2015), we then verified whether it was also effective in old and 3xTg-AD mice. First, interscapular BAT weight was slightly lower in 3xTg-AD compared to NonTg mice, but was not affected by the treatment (Fig. 3.2F). However, CL-316,243 administration increased the level of UCP1 protein in the BAT of both genotypes (Fig. 3.2G). Further confirming that CL-316,243 interacted with  $\beta$ 3AR, levels of  $\beta$ 3AR in BAT were significantly decreased only in NonTg treated mice, despite a tendency also in 3xTg-AD mice (Fig. 3.2G). We then measured the complexes I to V of the mitochondrial oxidative phosphorylation complex that are involved in heat production during thermogenesis in BAT (Nam and Cooper, 2015). Complex I was increased in NonTg and 3xTg-AD mice receiving the CL-316,243, and complex IV only in treated NonTg mice (Fig. 3.2I,J), further confirming that the  $\beta$ 3AR stimulation increased BAT thermogenesis. Altogether, our data showed that the  $\beta$ 3AR agonist administration improves BAT thermogenesis and heat production in 16-month-old mice.

### 1.5.3. $\beta$ 3AR stimulation reverses memory deficits in 16-month-old 3xTg-AD mice.

To determine whether CL-316,243 treatment exerted cognitive benefits in the 3xTg-AD mouse, recognition memory was evaluated with the NOR test 3 weeks before the beginning of the treatment (baseline, 14-month-old) and after the one-month treatment (final, 16-month-old) (Fig. 3.1A). The NOR test was selected because of its sensitivity and reliability to detect memory deficits in the 3xTg-AD mice at 12 months and older (Fig. 3.3A) (Arsenault et al., 2011; Clinton et al., 2007; Vandal et al., 2016). Comparing RI before (14 months) and after (16 months) the treatment revealed that one-month treatment with CL-316,243 increased by 19% the ability to recognize the new object in 3xTg-AD mice (paired t-test:  $p=0.0041$ ), while the change in RI was not

significantly different in NonTg or saline-injected 3xTg-AD mice (Fig. 3.3B,C). CL-316,243 from 15 to 16 months improved memory recognition in 3xTg-AD mice (RI=65% in CL-316,243-injected mice, one sample t-test versus 50%:  $p=0.0013$ ), but not in NonTg mice (Fig. 3.3D). The improved RI in 3xTg-AD treated mice was confirmed by the higher time spent on the novel (N) versus the familial (O) object (Fig. 3.3E). These differences were not explained by changes in exploratory behavior, as the mean duration of exploration was similar between groups (Fig. 3.3F). Finally, the percent change in RI before and after the treatment was positively correlated with UCP1 levels in BAT in 3xTg-AD ( $r^2=0.37$ ) but not in NonTg mice, suggesting a link between improved thermogenesis and memory (Fig. 3.3G).

We then verified that locomotor activity was not affected by CL-316,243 injections, as showed by comparable distance traveled and average speed of the mice during the open field test (Fig. 3.3H-J). Nonetheless, 2-way ANOVA revealed that 3xTg-AD mice displayed a higher average speed during the one-hour session compared to NonTg mice (Fig. 3.3J).

Anxiety is frequently observed in AD patient and is reproduced in 3xTg-AD mice (Hebda-Bauer et al., 2013; St-Amour et al., 2014; Vandal et al., 2016). However, the time spent in the illuminated compartment was not significantly different between groups in the present cohorts of animals (Fig. 3.3L). However, 3xTg-AD mice delayed their first exploration in the light chamber, as measured by the latency of the first nose entry in the light compartment (nose latency) (Fig. 3.3M), corroborating an anxiety-like behavior in those mice.

Overall, one-month administration of CL-316,243 improved recognition memory assessed at 16 months in 3xTg-AD mice, without affecting locomotion nor anxiety-like behavior.

#### 1.5.4. $\beta$ 3AR stimulation reduces insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus of 3xTg-AD mice but has no effect on tau phosphorylation nor synaptic proteins.

The main neuropathological markers of AD, amyloid plaques and tau pathology, progressively develop in the brain of 3xTg-AD mice (Belfiore et al., 2018; Iqbal et al., 2016; Oddo et al., 2003b; Selkoe and Hardy, 2016; Vandal et al., 2015b). Although total A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides in either soluble or insoluble fractions remained unchanged by the treatment in the hippocampus (Fig. 3.4A-D), we observed a 27% decrease in insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in CL-316,243-injected mice compared to saline-injected 3xTg-AD mice (Fig. 3.4E). However, amyloid plaques load in the hippocampus was unchanged (Fig. 3.4F). We subsequently assessed the effect of the  $\beta$ 3AR agonist on proteins implicated in the production (BACE-1, APP, APP C-terminal, sAPP $\alpha$ ) and clearance or degradation (LRP1, RAGE, IDE, X11 $\alpha$ ) of A $\beta$  peptides (Supplementary table 3.1) (Donahue et

al., 2006; Farris et al., 2003; Selkoe and Hardy, 2016). Since 3xTg-AD mice express human APP transgene, levels of APP were significantly higher in 3xTg-AD than in NonTg mice, but BACE-1, IDE, LRP1 and RAGE levels were stable in the hippocampus. However, levels of X11 $\alpha$  were decreased in 3xTg-AD mice compared to NonTg mice (Supplementary table 3.1).

We then assessed the level of phosphorylated and total tau protein in the detergent-soluble (cytosolic) and detergent-insoluble (aggregated proteins) fractions of hippocampus homogenates by Western Blot. We did not find any significant effect of CL-316,243 (Fig. 3.5) but confirmed that the 3xTg-AD mice display higher total and hyperphosphorylated tau proteins compared to NonTg mice. Main kinases involved in tau phosphorylation (GSK3 $\beta$  and AKT) were also unchanged (Supplementary table 3.1).

Synaptic deficits are one of the earliest markers of AD, correlating with symptoms (Arendt, 2009; Tremblay et al., 2017). The levels of synaptic proteins were not modified by the treatment (Supplementary table 3.1). However, drebrin protein was decreased specifically in 3xTg-AD mice (Two-way ANOVA, effect of genotype:  $p=0.0045$ ), as previously showed in the brain of AD subjects (Calon et al., 2004; Julien et al., 2008).

Since glucose transporters and uptake are decreased in AD (An et al., 2018; Kalaria and Harik, 1989; Y. Liu et al., 2008; Simpson et al., 1994), we assessed glucose transporter 1 (GLUT1) levels in the hippocampus of the mice. While we did not detect any effect of the CL-316,243 treatment, GLUT1 levels were decreased in the hippocampus of 3xTg-AD mice compared to NonTg mice, at both the endothelial (50 kDa) and astrocytic (45 kDa) isoforms (Supplementary table 3.1).

## **1.6. Discussion**

The present study aimed at investigating whether  $\beta$ 3AR agonist administration induces BAT thermogenesis and exerts an effect on cognitive behavior and AD neuropathology in a mouse model of the disease. The 3xTg-AD mouse was selected to test the effect of  $\beta$ 3AR stimulation in AD because this model displays age-dependent metabolic and thermoregulatory deficits and was shown to respond to thermoneutrality and BAT stimulation induced by repeated cold exposure (Knight et al., 2013; Tournissac et al., 2019; Vandal et al., 2016). This made us hypothesize that pharmacological BAT stimulation in this model could exert benefit on AD-like behavior and neuropathology. 15-month-old NonTg and 3xTg-AD mice received the selective  $\beta$ 3AR agonist CL-316,243 or saline for a month. We found that chronic administration of the agonist stimulated BAT

thermogenesis and improved glucose homeostasis. Enhanced thermogenesis was associated with reversed recognition memory impairment in 16 months 3xTg-AD mice and reduced insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus, while tau pathology remained unaffected.

### 1.6.1. $\beta$ 3AR agonist: a two in one strategy to target both metabolic and thermoregulatory defects

The most important characteristic of CL-316,243 is to improve metabolic disorders through enhanced BAT activity (Burkey et al., 2000; de Souza et al., 1997; Kim et al., 2006; A. Kumar et al., 2015; Labbé et al., 2016). In the present study,  $\beta$ 3AR agonist induced weight loss in both NonTg and 3xTg-AD mice. Food consumption was higher in 3xTg-AD compared to NonTg mice, in agreement with previous work in this mouse model (Adebakin et al., 2012; K. Do et al., 2018), and CL-316,243 increased food intake in NonTg mice. These data are consistent with increased energetic expenditure compensated with higher calorie intake following  $\beta$ 3AR stimulation (Gavrilova et al., 2000; Xiao et al., 2015). We previously showed that female 3xTg-AD mice display age-dependent glucose intolerance starting from 12 months (Vandal et al., 2015b). While the difference in glucose tolerance between NonTg and 3xTg-AD mice was not frank in the present work because only male mice were used, fasting blood glucose in 3xTg-AD was higher than in NonTg mice. It is noteworthy that the CL-316,243 improved peripheral glucose metabolism in 16-month-old mice of both genotypes. Of note, the improvement was observed in mice fed a chow diet, suggesting benefits even in non-diabetic animals.

Using hourly telemetric recordings of body temperature, we noted that 3xTg-AD mice displayed wider amplitude of body temperature throughout the day compared to NonTg mice, suggesting that thermoregulation in 3xTg-AD mice is affected.  $\beta$ 3AR agonist increased the amplitude of body temperature variation during the light phase, corresponding to the period of drug administration, but not during the dark phase. The wider variation in body temperature is consistent with higher body temperature after CL-316,243 injection, as shown by the temperature recorded a few hours after the first i.p. injection and previous work (Szentirmai and Kapás, 2017). However, we did not observe chronic hyperthermia, which would have been a major side effect of  $\beta$ 3AR agonists, perhaps compromising any potential translation to clinical use.  $\beta$ 3AR stimulation leads to increased thermogenic activity of BAT in young mice (Labbé et al., 2016; Poher et al., 2015; Xiao et al., 2015). While levels of  $\beta$ 3AR were decreased in NonTg treated mice, confirming that the agonist effectively binds to its target, this does not seem to alter higher BAT thermogenesis, as UCP1 protein levels were still high after a month (Nedergaard and Cannon, 2013). In addition, we observed an increase in the NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit 8 (NDUFB8 or complex I) in the BAT of CL-316,243-injected mice, further confirming that the  $\beta$ 3AR stimulation increases BAT thermogenesis and heat generation (Nam and Cooper, 2015). These

data support a sustained effect of CL-316,243 on BAT thermogenesis after a one-month chronic treatment.  $\beta$ 3AR agonists have been reported to enhanced energy expenditure and BAT thermogenic activity in humans as well (Cypess et al., 2015; Loh et al., 2018), but studies in the elderly are lacking. Overall, our data confirm that CL-316,243 was efficient to improve both thermoregulation and metabolic deficits, even in old mice.

### 1.6.2. $\beta$ 3AR stimulation reverses memory deficits in old 3xTg-AD mice

An important result of our study is the reversal of recognition memory deficit induced by  $\beta$ 3AR stimulation in 16-month-old 3xTg-AD mice. Indeed, we observed a +19% of RI between baseline (14 months) and post-treatment evaluation (16 months). These results were not explained by changes in exploratory behavior or locomotor activity. The RI of NonTg mice following treatment did not reach statistical significance perhaps due to lower statistical power (n=5) or a deleterious effect. No previous report on the behavioral effects of CL-316,243 treatment in mice was found in the literature. Nevertheless, the data also suggest that  $\beta$ 3AR-induced improvement in memory was specific to 3xTg-AD mice. The randomized-start design ensured that all animals were similar before undergoing saline or CL-316,243 treatment. Thus, our results are consistent with a disease-modifying effect of  $\beta$ 3AR stimulation in the 3xTg-AD mice.

Since metabolic disorders alter cognitive function and lead to memory defects (Abbondante et al., 2014; Gunstad et al., 2010; Rajasekar et al., 2017; Takeda et al., 2010; Tong et al., 2019), improved peripheral metabolism could be involved in better recognition memory in 3xTg-AD mice. However, it is not excluded that CL-316,243 has a direct effect on the CNS. Indeed,  $\beta$ 3AR are present in various regions of the brain, although to a much lower extent compared to the BAT (B. A. Evans et al., 1996; Summers et al., 1995), but their physiological roles in the CNS are not known. Although it has been shown that CL-316,243 increases sleep in mice (Szentirmai and Kapás, 2017) and reduces A $\beta$ -induced long-term memory deficits in chicks (Gibbs et al., 2010), the behavioral effects of  $\beta$ 3AR agonists are poorly investigated. Nonetheless, enhanced UCP1 levels in BAT were correlated with higher improvement in RI in 3xTg-AD mice, supporting the idea that higher BAT thermogenesis induced by  $\beta$ 3AR stimulation is involved in improved memory performance.

Previous studies reported that  $\beta$ 3AR agonists, including the CL-316,243, increase tryptophan content and serotonin synthesis in the brain (Claustre et al., 2008; Lenard et al., 2003). In addition, the SR856611A (Amibegron®) improves anxiety and depressive symptoms, as evaluated by the forced swim test and the elevated plus maze (Consoli et al., 2007; Stemmelin et al., 2008; Tamburella et al., 2010), and has been the subject of phase III clinical trial for depression (NCT0025330). We thus assessed anxiety-like behavior with the dark-light box emergence test but did not detect any change following the treatment in 16-month-old mice.



### 1.6.3. $\beta$ 3AR stimulation decreases insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus of 3xTg-AD mice

Another important result from our study is the decreased insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio by 27% in the hippocampus of old 3xTg-AD mice. Indeed, amyloid deposition is one of the main features of AD and is age-dependently reproduced in the 3xTg-AD mice (Oddo et al., 2003b; Vandal et al., 2015b). It is also currently the most important drug target and biomarker endpoint in clinical trials (Cummings et al., 2018; Selkoe and Hardy, 2016). Interestingly, the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio is increased in the familial form of AD and is inversely correlated with the age of onset of the disease (Kumar-Singh et al., 2006; Tanzi, 2012). Decreased A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio suggests a shift in APP cleavage from A $\beta$ 42 to A $\beta$ 40, which is less prone to aggregation than A $\beta$ 42. Importantly, increased A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio precedes amyloid plaque formation in the Tg2576 mouse model of AD (Jacobsen et al., 2006). Although we did not find changes in amyloid plaque loads after the one-month treatment, a longer or a preventive treatment could be necessary to detect a significant slowing of amyloid deposition in transgenic mice.

We did not find any changes in the level of tau phosphorylation following CL-316,243 administration. However, it does not mean that  $\beta$ 3AR stimulation has no effect at all on tau phosphorylation. Indeed, we recently showed that improved BAT thermogenesis through repeated cold exposure protects old 3xTg-AD mice from cold-induced tau phosphorylation (Tournissac et al., 2019). Thus, although not tested in the present study, it is possible that pharmacological  $\beta$ 3AR stimulation also confers protection against cold-induced tau phosphorylation. Finally, GLUT1 levels were decreased in the hippocampus of 3xTg-AD mice compared to NonTg mice, corroborating with defects in glucose uptake, blood-brain barrier transporters and decreased cerebral vascular volume observed in this mouse model of AD (Bourasset et al., 2009; T. M. Do et al., 2014; 2016; Nicholson et al., 2010).

### 1.6.4. Conclusion: potential translation to clinic

The present work aimed to determine whether  $\beta$ 3AR agonists could be repurposed in AD. This class of drugs is actively being tested in clinical studies for metabolic diseases, and CL-316,243 has been previously investigated in humans as well (Weyer et al., 1998). Importantly, Mirabegron® is FDA-approved for use for overactive bladder (Chapple et al., 2014b; Cypess et al., 2015), and large randomized controlled trials have confirmed its safety and tolerability profiles (Chapple and Siddiqui, 2017). Thus, the potential translation to clinical use of this class of drugs in AD is high. Nonetheless, it has to be noted that in humans, potential side

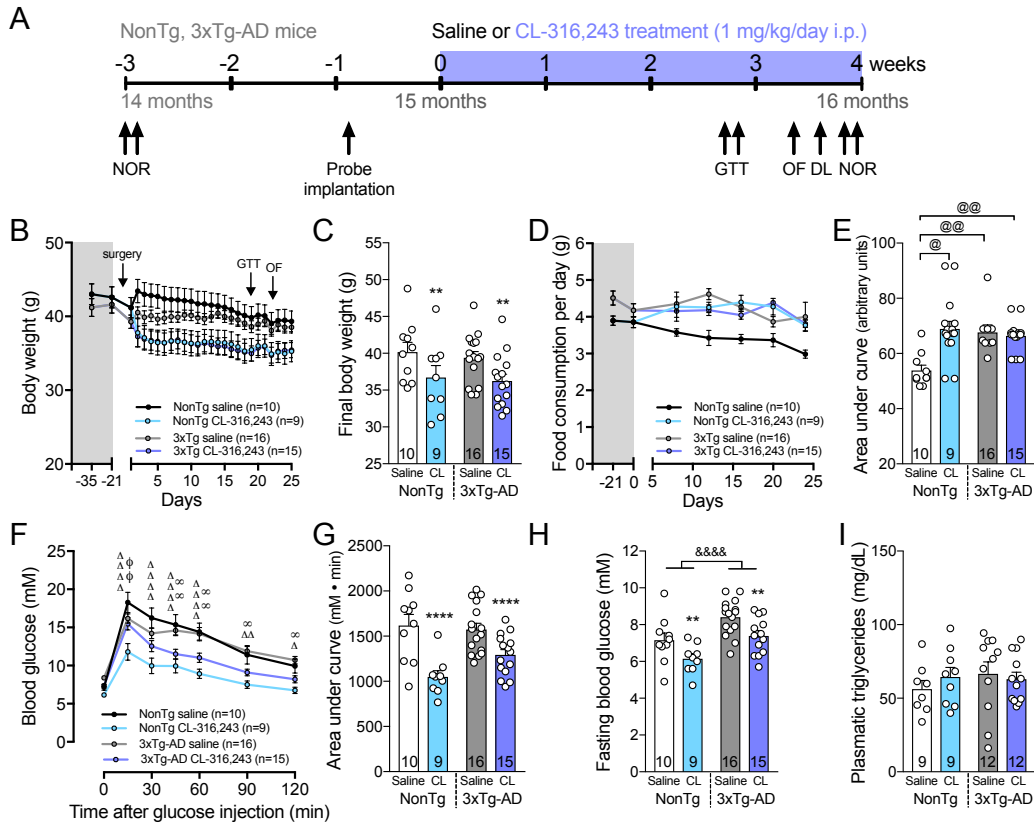
effects of  $\beta$ 3AR agonists include cardiovascular dysfunction induced by non-specific activation of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenergic receptors. Indeed, one administration of Mirabegron® at a dose of 200 mg (fourth times the clinical dose) is able to activate BAT activity in adults, but it also induces cardiac arrhythmia (Cypess et al., 2015). While the clinical dose of 50 mg does not seem to be efficient to acutely stimulate BAT (Baskin et al., 2018), a recent study showed that 100 mg of Mirabegron® enhances thermogenesis without any cardiovascular side effects in adults (Loh et al., 2018). Yet, long-term studies investigating chronic effect of  $\beta$ 3AR agonists in BAT thermogenesis in humans are needed.

Altogether, our results in a mouse model of AD demonstrate for the first time that  $\beta$ 3AR agonists are potent tools to reverse memory deficits and insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus. It is the first study to our knowledge to investigate the potential of this class of drugs in AD neuropathology and behavior.

## **1.7. Acknowledgements**

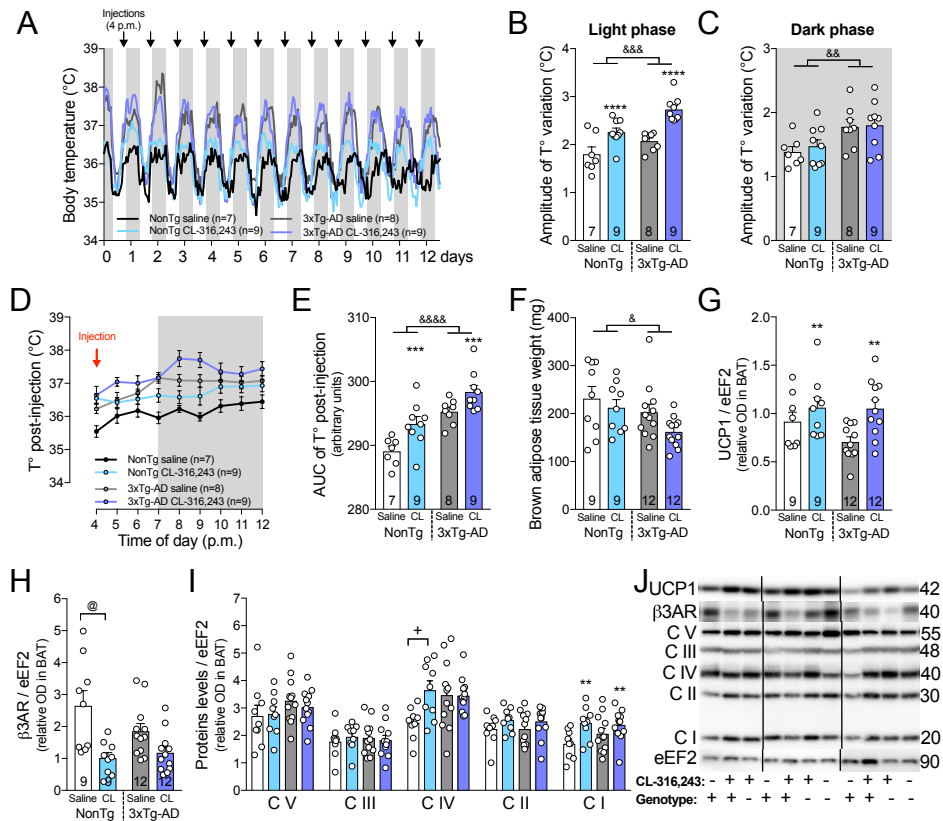
This study was made possible by funding from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 102532), the Quebec Network for Research on Aging, the Alzheimer Society of Canada (#1502), and the Canadian Foundation for Innovation (#34480). M.T. was funded by a scholarship from the Alzheimer Society of Canada. F.C. and E.P are a Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S) scholars (#253895, #26936, and #252178). F.C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. The authors have no conflict of interest to declare.

## 1.8. Figures



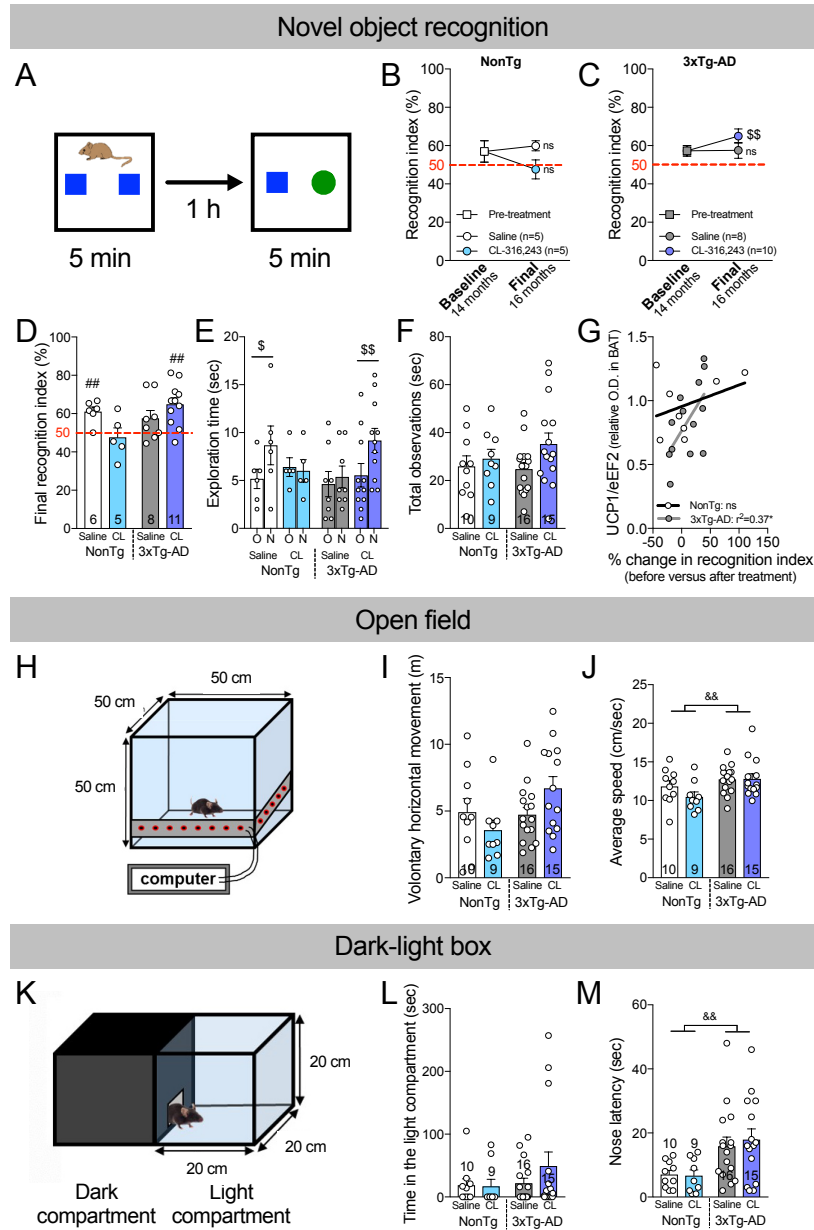
**Figure 3.1.  $\beta$ 3AR stimulation improves peripheral glucose metabolism in NonTg and 3xTg-AD mice.**

A: Schematic description of the experimentation. B: Body weight during the one-month experiment and C: at the end of the experiment. D: Food consumed per day per mice three weeks before and over the one-month treatment and E: area under curve of food consumption over the one-month treatment. F: GTT performed after 3 weeks of experiment and G: area under curve of the GTT. H: Fasting blood glucose during the GTT. I: Triglycerides measured in the plasma sampled at the end of the experiment. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in graphics). Statistics: Two-way ANOVA, effect of treatment: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; effect of genotype: &&& $p < 0.0001$  (C,G,H). Two-way repeated measures ANOVA, Tukey's post-hoc test:  $\Delta p < 0.05$ ;  $\Delta\Delta p < 0.01$ ;  $\Delta\Delta\Delta p < 0.0001$  (difference between NonTg groups);  $\infty p < 0.05$ ;  $\infty\infty p < 0.01$ ; (difference between 3xTg-AD groups);  $\Phi p < 0.01$  (difference between saline groups) (F). Kruskal-Wallis, Dunn's post-hoc test: @ $p < 0.05$ ; @@ $p < 0.01$  (E). NonTg: non-transgenic mice; 3xTg-AD: triple transgenic mice; DL: dark-light box test; GTT: glucose tolerance test; NOR: novel object recognition test; OF: open field.



**Figure 3.2. CL-316,243 treatment increases brown adipose tissue thermogenesis.**

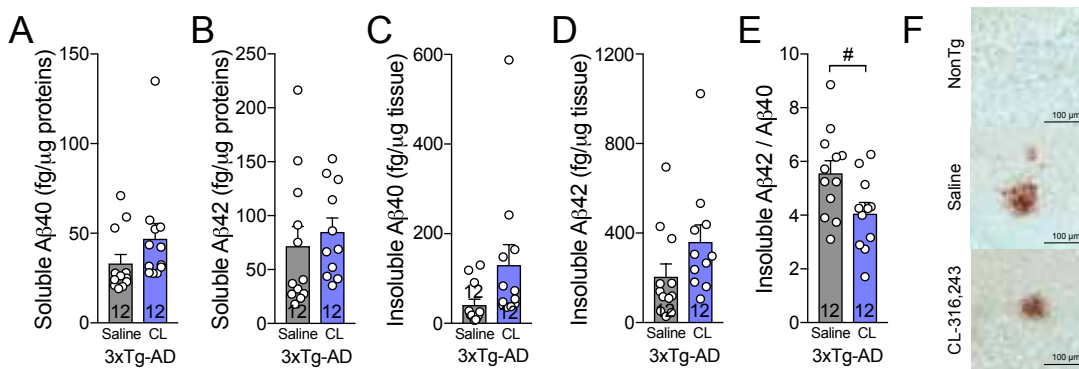
A: Graphical representation of body temperature recorded hourly by telemetric probe in the first two weeks of experiment (before glucose tolerance and behavioral tests). B: Mean amplitude of body temperature variation during the light (12-h, from 7 a.m.) and C: the dark phase (12-h, from 7 p.m.). D: Body temperature (T°) and E: area under curve of the T° after the first CL-316,243 or saline i.p. injection. F: Interscapular BAT weights. Levels of G: UCP1, H: β3AR and I: mitochondrial oxidative phosphorylation system on eEF2 proteins measured in BAT by Western blot. J: Examples of Western Blots. Data are represented as mean ± SEM (n/group indicated in graphics). Statistics: Two-way ANOVA, effect of treatment: \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; effect of genotype: &p<0.05; &&p<0.01; &&&p<0.001; &&&&p<0.0001 (B,C,E-G,I); Tukey's post-hoc test: \*p<0.05. Kruskal-Wallis (I), Dunn's post-hoc test: @ p<0.05 (H). *NonTg*: non-transgenic mice; *3xTg-AD*: triple transgenic mice; *T°*: body temperature; *UCP1*: uncoupling protein 1; *eEF2*: eukaryotic elongation factor 2; *OD*: optical density; *BAT*: brown adipose tissue; *β3AR*: β3 adrenergic receptor; *CV*, *CIII*, *CIV*, *CII*, *CI*: complex V, III, IV, II, I.



**Figure 3.3.  $\beta$ 3AR stimulation reverses memory deficits in 16-month-old 3xTg-AD.**

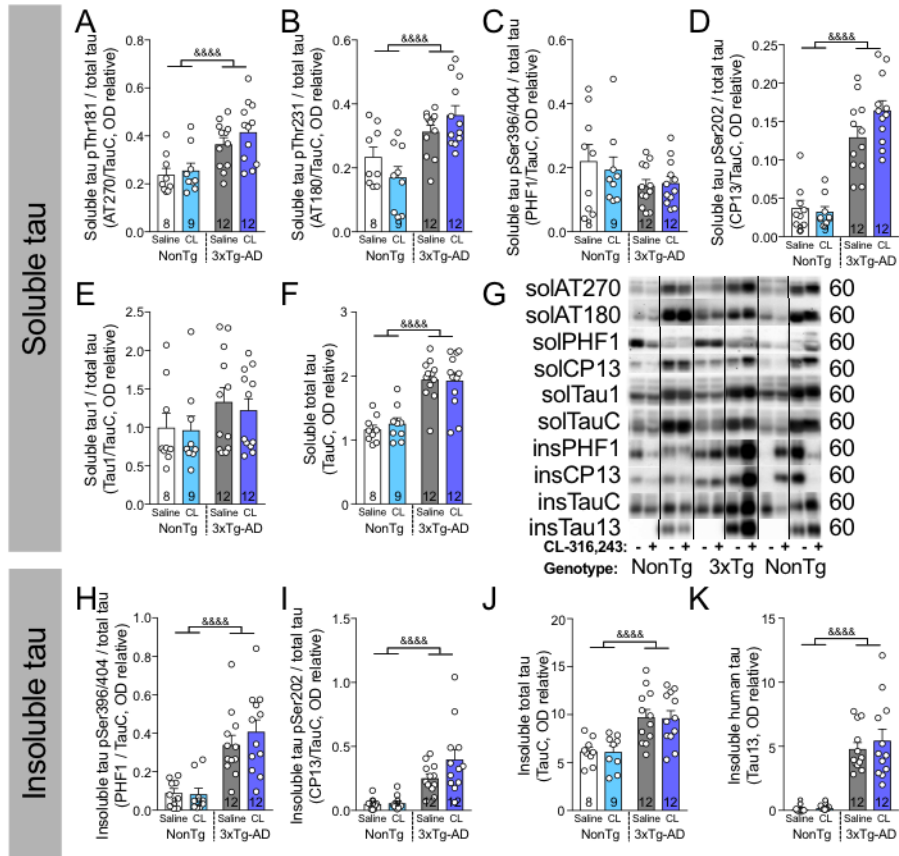
A: Description of the novel object recognition test. Evolution of the recognition index assessed before and after the treatment for the CL-316,243 and the saline-injected groups in B: NonTg and C: 3xTg-AD mice. D: Recognition index, E: time spent exploring the old (O) and the novel (N) object during the 5-minutes acquisition phase and F: total observations measured at the end of the experiment (final, 16-month-old mice). G: Correlation between % change in recognition index before and after the treatment and UCP1 levels measured in BAT. H: Representation of the open field apparatus. I: Total distance traveled and J: average speed during

the one-hour test. K: Representation of the dark-light box. L: Time spent in the light compartment and M: latency to do the first exploration in the light compartment. Recognition index = (time exploring the novel object / total exploration time) x 100. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in graphics). Statistics: Paired t-test (Baseline versus final recognition index (B,C); Old (O) versus novel (N) object (E)):  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{\$\$}p < 0.01$  (B,C,E). One sample t-test versus 50% (random chance):  $^{\#\#}p < 0.01$  (D). Pearson r correlation:  $^*p < 0.05$  (G). Two-way ANOVA, effect of genotype:  $^{\&\&}p < 0.01$  (J,M). *NonTg*: non-transgenic mice; *3xTg-AD*: triple transgenic mice; *O*: old object; *N*: novel object.



**Figure 3.4.  $\beta$ 3AR stimulation reduces insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in the hippocampus of 3xTg-AD mice.**

Human A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides measured by ELISA in the A,B: detergent-soluble and in the C,D: detergent-insoluble fractions of hippocampus homogenates of 3xTg-AD mice. E: Ratio of insoluble A $\beta$ 42 on A $\beta$ 40 peptides. F: Immunohistochemistry of amyloid plaques detected with the MOAB-2 antibody in the hippocampus of 3xTg-AD mice (20X magnification). Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in bars). Statistics: Unpaired Student t-test:  $^{\#}p < 0.05$ .



**Figure 3.5.  $\beta$ 3AR stimulation has no effect on tau phosphorylation in the hippocampus of 3xTg-AD mice.**

Phosphorylated and total tau protein measured in A-F: detergent-soluble and H-K: detergent-insoluble fractions of hippocampus homogenates of non-transgenic and 3xTg-AD mice. G: Examples of Western Blots. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n/group indicated in bars). Statistics: Two-way ANOVA, effect of genotype: &&&&p<0.0001.

## 1.9. Supplementary data

	NonTg				3xTg-AD				Two-way ANOVA (p values)		
	Saline		CL-316,243		Saline		CL-316,243		Genotype	Treatment	Interactions
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			
<b>Synaptic proteins</b>											
Drebrin	2,46 ± 0,55		2,66 ± 0,53		2,25 ± 0,35		2,04 ± 0,34		p=0.0045**	ns	ns
PSD95	7,17 ± 1,59		7,03 ± 1,27		6,86 ± 0,61		6,41 ± 0,66		ns	ns	ns
Septin 3	2,19 ± 0,93		2,13 ± 0,76		2,21 ± 1,02		2,23 ± 1,14		ns	ns	ns
<b>Kinases</b>											
GSK3β(Ser9) / GSK3β tot	0,21 ± 0,16		0,18 ± 0,13		0,21 ± 0,14		0,21 ± 0,10		ns	ns	ns
AKT (Ser473) / AKT tot	0,30 ± 0,14		0,32 ± 0,13		0,33 ± 0,11		0,37 ± 0,22		ns	ns	ns
<b>APP production and clearance</b>											
BACE-1	4,21 ± 1,83		3,99 ± 1,43		4,49 ± 2,26		4,37 ± 2,26		ns	ns	ns
APP (6E10)	0,10 ± 0,04		0,13 ± 0,07		1,35 ± 0,71		1,46 ± 0,87		n/a†	ns	ns
APP (22C11)	1,16 ± 0,44		1,22 ± 0,41		2,81 ± 1,46		2,91 ± 1,60		p<0.0001****	ns	ns
APP C-terminal fragment	2,27 ± 1,01		2,34 ± 0,91		4,04 ± 2,16		4,17 ± 2,31		n/a†	ns	ns
sAPPα	0,21 ± 0,08		0,25 ± 0,09		1,84 ± 0,88		1,87 ± 0,90		n/a†	ns	ns
X11α	1,98 ± 0,47		2,07 ± 0,42		1,32 ± 0,28		1,28 ± 0,33		p<0.0001****	ns	ns
IDE	2,45 ± 0,48		2,62 ± 0,35		2,31 ± 0,58		2,19 ± 0,71		ns	ns	ns
LRP1	1,36 ± 0,33		1,38 ± 0,38		1,40 ± 0,42		1,36 ± 0,46		ns	ns	ns
RAGE	1,90 ± 0,87		1,81 ± 0,58		2,29 ± 1,16		2,39 ± 1,25		ns	ns	ns
<b>Others</b>											
Bax / Bcl-2	11,51 ± 7,44		10,05 ± 5,41		10,61 ± 3,32		12,18 ± 5,61		ns	ns	ns
GFAP	3,10 ± 1,26		2,81 ± 0,95		3,53 ± 1,73		3,89 ± 1,86		ns	ns	ns
NeuN	1,58 ± 0,41		1,63 ± 0,32		1,69 ± 0,35		1,69 ± 0,38		ns	ns	ns
GLUT1 50 kDa	0,64 ± 0,20		0,59 ± 0,38		0,36 ± 0,20		0,36 ± 0,11		p=0.0014**	ns	ns
GLUT1 45 kDa	2,76 ± 0,71		2,80 ± 0,72		2,26 ± 0,34		2,20 ± 0,38		p=0.0022**	ns	ns

n/a†: non applicable, human-specific antibody

### Supplementary Table 3.1. Other AD markers not affected by CL-316,243 treatment.

Relative optical density of proteins normalized on actin measured in detergent-soluble fraction of hippocampus homogenates by Western Blot. Data are represented as mean ± SD, n= 9-12 per group.



Antibody	Clone	Specificity	Host	Source
<b>Primary antibodies</b>				
Actin	monoclonal	$\beta$ -actin	Mouse	Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada)
AKT	polyclonal	AKT a.a. 345-480	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
AKT (phospho Ser473)	polyclonal	AKT, phosphorylated at Ser-473	Rabbit	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
A $\beta$ (MOAB-2)	6C3	Amyloid- $\beta$ 40 and 42, unaggregated, oligomeric and fibrillar	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
APP/A $\beta$ (6E10)	6E10	APP a.a. 1-16	Mouse	Covance, Inc. (Princeton, NJ, USA)
APP (22C11)	monoclonal	All three forms of APP: immature, sAPP and mature	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
APP CTF	polyclonal	a.a. 751-770 of APP	Rabbit	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
sAPP $\alpha$	2B3	Synthetic peptide of the C-terminal part of Human sAPP $\alpha$	Mouse	IBL (Fujioka, Japan)
$\beta$ 3AR	polyclonal	mouse beta 3 adrenergic receptor, aa 350 to C-terminus	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
BACE-1	monoclonal	synthetic peptide (ab108394)	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Bax	polyclonal	total bax protein	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Bcl-2	polyclonal	total bcl-2 alpha protein	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Drebrin	Mx823	c-term peptide (a.a.632-649)	Mouse	Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany)
eEF2	polyclonal	total eEF2 protein independent of phosphorylation	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
GFAP	GA-5	GFAP	Mouse	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
GLUT1	monoclonal	synthetic peptide, c-terminus (ab40084)	Mouse	Abcam (Cambridge, MA, USA)
GSK3 $\beta$	monoclonal	Rat GSK-3 $\beta$ aa. 1-160	Mouse	BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada)
GSK3 $\beta$ (phospho Ser9)	polyclonal	GSK3 $\beta$ , phosphorylated at Ser-9	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
IDE	polyclonal	a.a. 93-273	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
LRP1	EPR3724	synthetic peptide	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
Mitochondrial oxidative phosphorylation system	monoclonal	Total OXPHOS complexes: CI, CII, CIII, CIV and CV subunits	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
NeuN	monoclonal	a.a. 1-100	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
PSD95	monoclonal	aa 77-299	Mouse	NeuroMab (Davis, CA, USA)
RAGE	monoclonal	Gly23 - Leu342	Rat	R&D system (Minneapolis, MN, USA)
Septin3	polyclonal	synthetic peptide	Rabbit	Novus biologicals (Oakville, ON, Canada)
Tau (total) TauC	polyclonal	c-terminal region of tau protein	Rabbit	Dako (Burlington, ON, Canada)
Tau (total)	Tau13	Total human tau	Rabbit	Dako (Burlington, ON, Canada)
Tau (phospho)	Tau1-PC1C6	Tau, phosphorylated at Ser195, Ser198, Ser199 and Ser202	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Tau (phospho)	AT180	Tau, phosphorylated at Thr-231	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
Tau (phospho)	AT270	Tau, phosphorylated at Thr-181	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
Tau (phospho)	CP13	Tau, phosphorylated at Ser-202	Mouse	Generous gift from Peter Davies
Tau (phospho)	PHF1	Tau, phosphorylated at Ser-396 and Ser-404	Mouse	Generous gift from Peter Davies
UCP1	monoclonal	a.a. 145-159	Rabbit	Abcam (Cambridge, MA, USA)
X11 $\alpha$	polyclonal	X11, a.a. 1-220	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
<b>Secondary antibodies</b>				
Goat anti-mouse		Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG (H+L)	Goat	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
Goat anti-rabbit		Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L)	Goat	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)

Supplementary Table 3.2. Antibodies used in this study.

# Conclusion

Cette section de la thèse comprend un retour sur les résultats des articles présentés ci-dessus, puis une discussion sur les limites, les questions soulevées et les perspectives de nos résultats. Enfin, elle se terminera par une conclusion générale.

## 1 Retour sur les résultats

### **Chapitre 1 : L'âge avancé potentialise la phosphorylation de tau induite par le froid : lien entre déficit de thermorégulation et maladie d'Alzheimer.**

Cette étude fait suite aux résultats d'une première publication de notre équipe montrant que les souris 3xTg-AD sont plus susceptibles à une exposition au froid que les souris NonTg, dans le sens où l'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau dans leur cortex est plus importante que les souris contrôles (Figure 14) (Vandal et al., 2016).

L'objectif de ce travail était de vérifier si l'âge pouvait être un facteur aggravant la phosphorylation de tau en réponse à une diminution de température corporelle. Nous avons donc exposé des souris jeunes (6 mois) et âgées (18 mois) à une température de 4°C pendant 24 heures, puis analysé la phosphorylation de tau sur différents épitopes dans le cortex pariéto-temporal. Tout d'abord, nous avons observé une diminution de la température corporelle d'environ 2°C et une augmentation de l'expression d'UCP1 dans le TAB de manière équivalente entre les souris jeunes et âgées. Ensuite, nous avons de nouveau confirmé l'augmentation drastique de la phosphorylation de la protéine tau en réponse à une diminution de température corporelle. De façon intéressante, la phosphorylation de tau sur les épitopes Thr231 et Thr181 était significativement augmentée seulement pour les souris âgées, tandis que les souris jeunes présentaient une plus grande inactivation de la kinase GSK3 $\beta$  (mesurée par la phosphorylation sur la Ser9). Ces résultats suggèrent que l'âge est un facteur qui potentialise l'effet de la diminution de la température corporelle sur la phosphorylation de la protéine tau. Cette différence entre souris jeunes et âgées pourrait s'expliquer par un manque d'inactivation de la GSK3 $\beta$  chez les souris âgées.

Cette étude propose une explication originale quant au fait que les personnes âgées soient les principales touchées par la MA : l'âge avancé augmente la susceptibilité à la phosphorylation de la protéine tau induite par une hypothermie. Comme les personnes âgées présentent un déficit de thermorégulation et sont plus à risque d'hypothermie (Gomolin et al., 2005; Hoshino et al., 2007; Sugarek, 1986), des épisodes plus fréquents de basse température corporelle pourraient conduire à une hyperphosphorylation de tau répétée. Ces effets pourraient être additifs pour finalement conduire à la formation d'ENF et éventuellement au développement de la MA. Toutefois, l'hyperphosphorylation de la protéine tau suite à une hypothermie reste à démontrer chez l'humain.

En revanche, il ne faudrait pas tirer de nos résultats la simple conclusion que la température ambiante est dangereuse pour les personnes âgées et qu'il suffirait de les maintenir à des températures plus élevées pour prévenir la démence. Nous avons utilisé une exposition à une température ambiante froide comme méthode pour diminuer rapidement la température corporelle des animaux et induire une réponse thermogénique. Bien qu'une semaine d'exposition à une température thermoneutre soit bénéfique pour les souris 3xTg-AD (Vandal et al., 2016), il s'agit bien de la modification de la température corporelle, et non simplement de la température externe, qui induit un changement de la phosphorylation de la protéine tau. En effet, plusieurs études ont montré que l'hypothermie induite par une anesthésie ou une diminution du métabolisme (hypoglycémie ou hibernation) provoque également cette hyperphosphorylation de tau, sans modification de la température ambiante (Planel et al., 2009; 2004; Stieler et al., 2011). De plus, maintenir la température corporelle des animaux suite à une anesthésie prévient ce phénomène (Planel et al., 2007; 2004).

Ainsi, il est nécessaire de mieux comprendre par quels mécanismes les changements de température corporelle influencent la phosphorylation de la protéine tau. L'hypothèse découlant de ces deux premières études est que la modulation (à la hausse ou à la baisse) des mécanismes de thermorégulation influence la neuropathologie Alzheimer (Tournissac et al., 2017; Vandal et al., 2016). Cette hypothèse a été investiguée dans les deux chapitres suivants.

## **Chapitre 2 : Les expositions répétées au froid protègent un modèle murin de la maladie d'Alzheimer de la phosphorylation de tau induite par le froid.**

L'objectif de ce deuxième chapitre était de déterminer l'effet d'une stimulation de l'activité du TAB de manière « naturelle » ou non-pharmacologique sur la neuropathologie Alzheimer chez la souris 3xTg-AD âgée. Nous

avons sélectionné la souris 3xTg-AD car elle présente à la fois les pathologies tau et amyloïde, qui sont les deux marqueurs neuropathologiques principaux de la MA (Oddo et al., 2003b; Querfurth and LaFerla, 2010). De plus, le développement de la neuropathologie se fait de manière très progressive dans le cerveau de ces souris (Belfiore et al., 2018; Vandal et al., 2015b), nous permettant d'inclure le facteur de l'âge avancé, si important dans la MA (Rocca et al., 2011b; Solomon et al., 2014). Nous avons précédemment montré que cette souris développait également des désordres métaboliques et un déficit de thermorégulation au fur et à mesure de son vieillissement, faisant d'elle un modèle de choix pour la présente étude (Vandal et al., 2016; 2015b; 2014b).

Nous avons choisi de faire des expositions répétées au froid pour stimuler le TAB, une méthode bien connue pour réduire les désordres métaboliques en augmentant la thermogénèse, que ce soit chez le rongeur ou chez l'humain (Hanssen et al., 2015b; Ravussin et al., 2014; van der Lans et al., 2013). Cette approche se voulait globale : elle ne fait pas intervenir uniquement la thermogénèse du TAB mais aussi la thermogénèse avec frissons des muscles squelettiques (Blondin et al., 2017; Cannon and Nedergaard, 2004; Silva, 2006). Elle est donc moins spécifique à l'activité du TAB que l'approche pharmacologique utilisée dans le troisième chapitre. Nous aurions pu réaliser une acclimatation au froid plus progressive en plaçant les animaux dans une pièce dont la température diminue de 2°C par jour pour atteindre une température de 4°C afin de stimuler la thermogénèse de façon plus chronique et non pas intermittente (Mineo et al., 2012). Toutefois, ce protocole est plus demandant au niveau métabolique pour la souris à long terme, ce qui n'est peut-être pas adapté pour un animal âgé. Aussi, il aurait été impossible de réaliser le test de tolérance au glucose sur des animaux dans la chambre froide puisque la combinaison du jeûne de 6 heures et de l'exposition au froid aurait induit un stress métabolique et une hypoglycémie plus importante, ce qui est trop risqué pour nos animaux âgés de 16 mois.

Nous avons donc exposé de façon quotidienne des souris 3xTg-AD de 16 mois à 4°C pour une durée relativement courte de 4 heures à raison de cinq fois par semaine. Ce protocole d'acclimatation au froid a duré quatre semaines pendant lesquelles un groupe contrôle est resté à la température d'hébergement de 22°C. À la fin de la 4<sup>ème</sup> semaine, un groupe de souris contrôle a subi une exposition au froid aiguë (4°C, 24 heures) de même que le groupe ayant reçu les expositions répétées au froid. Cette expérience nous a permis de constater qu'il était possible d'augmenter la thermogénèse des 3xTg-AD âgées de 16 mois, tout en améliorant leur métabolisme du glucose périphérique et en diminuant les triglycérides plasmatiques. Mais surtout, stimuler la thermogénèse de façon répétée a permis de protéger les souris transgéniques de l'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau dans l'hippocampe induite par une exposition au froid aiguë. Nous avons finalement tenté de mettre en lien ces résultats avec une batokine : FGF21. Nous avons observé une

plus grande quantité plasmatique de FGF21 chez les souris acclimatées au froid, quantité corrélée négativement avec la phosphorylation de tau dans l'hippocampe de ces animaux.

Ainsi, nos résultats suggèrent qu'une meilleure capacité de thermogénèse permet de contrer la phosphorylation de tau induite par une exposition aiguë au froid. Le changement d'activité des kinases et des phosphatases, principalement la PP2A, est le principal mécanisme proposé pour la modulation de la phosphorylation de la protéine tau en réponse à un changement de température corporelle (Planel et al., 2007; 2001). Toutefois, nous n'avons pas observé de diminution significative des principales kinases impliquées dans la phosphorylation de tau, ni d'augmentation de la quantité de PP2A dans le groupe de souris acclimatées au froid, mais il n'est pas exclu que son activité soit modulée par notre traitement. En revanche, nos résultats proposent qu'un lien plus direct entre activité du TAB et phosphorylation de tau existe : ce lien pourrait se faire via la sécrétion de molécules de signalisation par le TAB (les batokines), et plus spécifiquement FGF21 (Hondares et al., 2011; Villarroja et al., 2017). En effet, nous avons observé une corrélation inverse entre les niveaux plasmatiques de FGF21 et la phosphorylation de la protéine tau dans l'hippocampe, suggérant que des niveaux élevés de cette batokine pourraient être associés à une préservation des niveaux de phosphorylation de tau. Toutefois, ceci n'est que corrélatif et les effets des batokines sur le cerveau commencent à peine à être étudiés.

### **Chapitre 3 : Un agoniste des récepteurs $\beta$ 3 adrénergiques renverse les déficits mnésiques et réduit la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.**

L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet de la stimulation de la thermogénèse du TAB à l'aide d'un agoniste spécifique des R $\beta$ 3A sur la neuropathologie et le comportement des souris 3xTg-AD âgées de 16 mois. Plus largement, nous voulions savoir si cette molécule pourrait être un bon candidat pour le traitement de la MA. Nous avons sélectionné la souris 3xTg-AD car cette souris présente à la fois les pathologies tau et amyloïde associées à déficits cognitifs. Des souris 3xTg-AD et non-transgéniques (NonTg) âgées de 15 mois ont reçu le CL-316,243 à une dose de 1 mg/kg, un agoniste spécifique des R $\beta$ 3A, ou du salin, tous les jours pendant un mois.

Nous avons d'abord confirmé que le CL-316,243 permettait d'améliorer le métabolisme périphérique des souris de 16 mois, quel que soit leur génotype, en diminuant leur poids et en améliorant leur tolérance au glucose, même si ces souris n'étaient pas diabétiques. Une amélioration du métabolisme du glucose sur des

souris non diabétiques a déjà été observée précédemment, mais sur des souris plus jeunes (Xiao et al., 2015). D'autre part, la prise alimentaire était augmentée uniquement chez les NonTg en réponse au traitement, rejoignant le niveau de consommation des souris 3xTg-AD. De plus, l'agoniste des R $\beta$ 3A a permis d'augmenter la thermogénèse des animaux âgés comme l'indiquent la hausse de température corporelle post-injection ainsi que l'augmentation d'UCP1 et du complexe I de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondrial. Bien que les améliorations métaboliques et l'augmentation de l'activité de thermogénèse du TAB suite à l'administration du CL-316,243 soient bien connues, il s'agit de la première étude testant cette molécule sur des animaux âgés à notre connaissance. Les souris âgées montrant une thermorégulation moins efficace que les souris jeunes (Gonzales and Rikke, 2010; Talan, 1997; Tatelman and Talan, 1990), il aurait été possible que l'agoniste ait peu ou pas d'effet sur les souris âgées, et d'autant plus pour les souris 3xTg-AD, qui présentent un déficit de thermorégulation.

Le traitement d'un mois avec l'agoniste a permis de réduire le déficit cognitif des souris 3xTg-AD âgées. À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration d'un effet mnésique d'un agoniste des R $\beta$ 3A dans un modèle murin de la MA. En effet, seulement une étude à notre connaissance a observé une amélioration mnésique chez des poussins ayant reçu une injection de peptides A $\beta$ 42 après administration intracrânienne de CL-316,243 (Gibbs et al., 2010). De plus, nous avons observé une corrélation positive entre la quantité d'UCP1 dans le TAB et le pourcentage d'augmentation du score au test de reconnaissance d'objet spécifiquement chez les souris 3xTg-AD, suggérant que cette meilleure performance était liée à l'augmentation de thermogénèse du TAB. En revanche, le test de reconnaissance d'objet avec seulement une heure d'intervalle entre les deux phases, bien qu'adapté pour la souris 3xTg-AD âgée, ne permet pas de savoir si cet effet est spécifique aux souris présentant un déficit cognitif, ou bien si le CL-316,243 a un effet global d'amélioration de la mémoire. Pour répondre à cette question, il faudrait réaliser des tests plus sensibles avec une tâche plus difficile pour détecter une amélioration mnésique sur des souris sans trouble de la mémoire. Par exemple, il faudrait faire un test de reconnaissance d'objet avec un intervalle de 24 heures entre les deux phases (correspondant à l'évaluation de la mémoire à long terme), ou encore un test de localisation d'objet, permettant d'évaluer la mémoire spatiale, sur des souris jeunes et non-transgéniques (Cohen et al., 2013; Leger et al., 2013; Vogel-Ciernia and Wood, 2014).

Contrairement à nos deux précédentes études, l'agoniste des R $\beta$ 3A n'a eu aucun effet sur la phosphorylation de la protéine tau (Tableau C1). Au vu des améliorations métaboliques des souris ayant reçu le traitement, nous aurions pu nous attendre à une diminution de la phosphorylation de la protéine tau. Il n'est toutefois pas exclu que, comme nos résultats obtenus avec les expositions répétées au froid, l'agoniste des R $\beta$ 3A permettent de protéger les souris contre une hyperphosphorylation de tau induite par une exposition aiguë au froid. Une exposition de 24 heures à 4°C après l'administration du CL-316,243 pendant un mois permettrait de

répondre à cette question. En revanche, cette méthode pharmacologique a quant à elle eu des effets bénéfiques sur la pathologie amyloïde. Plus précisément, le ratio de peptides A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 insolubles était diminué dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD ayant reçu le traitement. À titre de comparaison, nous avons précédemment montré qu'une exposition à une température thermoneutre de 28°C diminuait les niveaux d'A $\beta$ 42 insolubles dans le cortex des souris 3xTg-AD en augmentant la quantité du transporteur LRP1 (Tableau C1) (Vandal et al., 2016). Toutefois, nous n'avons ici observé aucun changement dans la quantité de LRP1, RAGE ou encore BACE-1 et APP. Il est possible que les améliorations du métabolisme périphérique des souris soient en lien avec la diminution du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. En effet, une précédente étude de notre équipe montre qu'une injection d'insuline induit une clairance des peptides A $\beta$  du cerveau vers la périphérie chez la souris 3xTg-AD, sans pour autant modifier la quantité de LRP1 (Vandal et al., 2014b). Les liens entre altérations métaboliques et neuropathologie de la MA seront discutés plus en détail dans la section « 2.4 Mécanismes potentiels par lesquels la thermogénèse peut affecter la MA ».

Traitement	Souris	Comportement	Neuropathologie	Référence
<b>Exposition aiguë</b> (4°C, 24 h)	NonTg et 3xTg-AD 12 mois	ND	↑ pTau ↑ APP, soluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ↓ protéines synaptiques	Vandal 2016
<b>Exposition aiguë</b> (4°C, 24 h)	NonTg 6 et 18 mois	ND	↑ pTau = protéines synaptiques	Tournissac 2017 <b>(chapitre 1)</b>
<b>Exposition aiguë</b> (4°C, 24 h)	3xTg-AD 16 mois	ND	↑ pTau = A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 = protéines synaptiques	Tournissac 2019 <b>(chapitre 2)</b>
<b>Expositions répétées</b> (4°C, 4h par jour, un mois)	3xTg-AD 16 mois	ND	Protection contre pTau = A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 = protéines synaptiques	Tournissac 2019 <b>(chapitre 2)</b>
<b>Thermoneutralité</b> (28°C, une semaine)	3xTg-AD 20 mois	↑ mémoire de reconnaissance ↓ anxiété = locomotion	= pTau ↓ insoluble A $\beta$ 42; ↑ LRP1 ↑ protéines synaptiques	Vandal 2016
<b>Agoniste des R<math>\beta</math>3A</b> (CL-316,243, 1 mg/kg par jour, un mois)	3xTg-AD 16 mois	↑ mémoire de reconnaissance = anxiété = locomotion	= pTau ↓ insoluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 = protéines synaptiques	Tournissac, en préparation <b>(chapitre 3)</b>

**Tableau C1. Effets des différentes approches pour moduler la thermorégulation sur la neuropathologie de la MA chez la souris.**

De manière générale, notre étude est la première à avoir testé cette classe de molécule dans la MA. Nos résultats suggèrent que les agonistes des R $\beta$ 3A seraient bénéfiques pour la MA, du moins en ce qui a trait à la pathologie amyloïde et la mémoire de reconnaissance. Bien que des études plus longues et sur d'autres

modèles animaux soient nécessaires pour confirmer nos résultats, il s'agit d'une toute première preuve de concept qu'agir sur les R $\beta$ 3A représente une cible thérapeutique intéressante pour la MA.

## 2 Discussion générale et perspectives

### 2.1 Température corporelle et phosphorylation de la protéine tau

Les phospho-épitopes de tau que nous avons analysés dans nos différentes études ont été sélectionnés pour leur importance quant à la MA car ils corrélaient avec le diagnostic clinique et les déficits cognitifs, incluant la mémoire épisodique (Tremblay et al., 2007). En effet, une précédente étude de notre équipe a comparé un grand nombre de marqueurs neuropathologiques dans les cerveaux de volontaires de la *Religious Order study* qui ont été cliniquement caractérisés de leur vivant (Tremblay et al., 2017). Les résultats montrent que la phosphorylation de tau sur l'épitope PHF1 ou AD2 (pSer396/404) est fortement corrélée avec le diagnostic clinique de la MA, même dans la fraction soluble. Ce même épitope est aussi associé avec le score de Braak et la propagation des ENF. Par ailleurs, les épitopes AT180 (pThr231) et PHF1, que ce soit dans la fraction soluble ou insoluble, sont négativement corrélés avec le score cognitif global des sujets. Bien qu'une seule exposition au froid de 24 heures ne semble pas suffisante pour induire une augmentation de tau dans la fraction insoluble, une hypothermie prolongée ou répétée pourrait augmenter l'agrégation de tau et l'apparition d'ENF. En effet, les études *in vitro* montrent que les phospho-épitopes que nous avons étudiés sont impliqués dans l'agrégation pathologique de la protéine tau (Martin et al., 2011).

Nous avons de nouveau confirmé dans nos travaux chez la souris que la phosphorylation de tau était augmentée lorsque la température corporelle diminue. En revanche, l'effet d'une diminution de la température corporelle sur la phosphorylation de la protéine tau chez l'humain demeure inconnu. Cela pourrait éventuellement être étudié grâce à l'imagerie cérébrale avec des ligands dirigés contre la protéine tau totale et phosphorylée, actuellement testés chez l'humain, suite à une exposition au froid (Okamura et al., 2018). Une alternative serait de réaliser un dosage de la protéine tau phosphorylée et totale dans le LCR des participants.

D'autre part, les études présentées dans cette thèse soulèvent la question de savoir si l'augmentation de la phosphorylation de tau en réponse à l'hypothermie perdure dans le temps ou si elle n'est que transitoire. Des précédentes études apportent des éléments de réponse. Dans le cas d'animaux qui hibernent, celle-ci est



transitoire : comme mentionné en introduction, il s'agirait d'un mécanisme de protection mis en place pour protéger le cerveau de l'hypométabolisme (Arendt et al., 2003; Arendt and Bullmann, 2013; Stieler et al., 2011). Tandis que certaines études avec l'anesthésie observent également un retour à la normal rapide (Whittington et al., 2015), d'autres rapportent qu'elle pourrait avoir des répercussions à long terme dans le cas d'expositions répétées par exemple (Le Freche et al., 2012; Planel et al., 2009). Il serait intéressant de refaire la même expérience que dans le chapitre 1 avec des animaux jeunes et âgés, en ajoutant des souris transgéniques, et de sacrifier les animaux soit immédiatement, soit plusieurs jours après une exposition aiguë au froid. Nous avons d'ailleurs en partie réalisé ces investigations sur des souris non-transgéniques de 12 mois (Figure C1) : ces résultats montrent qu'après une seule exposition au froid de 24h à 4°C induisant une diminution de la température corporelle d'environ 2°C, la phosphorylation de tau sur les épitopes pThr231 (fraction soluble) et pSer396/404 (fraction insoluble) persiste jusqu'à 7 jours, malgré le retour à la normal de la température des animaux. Toutefois, il est possible que cet effet persistant soit présent uniquement chez les animaux âgés et pas chez les souris jeunes, puisque nous avons montré dans le chapitre 1 que les plus âgées sont plus susceptibles à l'hyperphosphorylation de tau induite par une diminution de température corporelle.

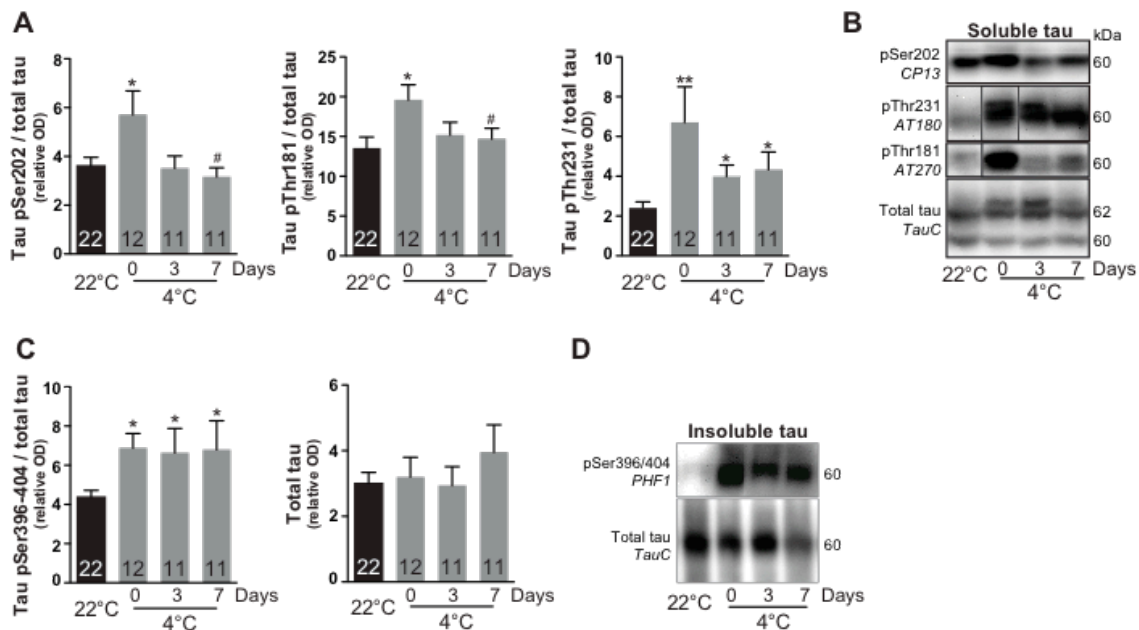


Figure C1. Persistance de l'hyperphosphorylation de tau après une seule exposition au froid de 24 heures à 4°C chez des souris non-transgéniques de 12 mois.

Les souris non-transgéniques de 12 mois ont été exposées au froid pendant 24 heures à 4°C, puis ont été sacrifiées par perfusion intracardiaque immédiatement, 3 ou 7 jours après l'exposition au froid, tandis qu'un groupe est resté à 22°C. La phosphorylation de tau soluble (A,B) et insoluble (C,D) a été quantifiée par Western Blot dans des homogénats de cortex pariéto-temporal. Statistiques : test t de Student non apparié : différence par rapport au groupe 22°C: \*p<0.05; \*\*p<0.01; différence par rapport au groupe 4°C, 0 day: #p<0.05. *Données non publiées.*

Bien que l'anesthésie ait un effet sur la phosphorylation de la protéine tau, elle est obligatoire pour des raisons éthiques évidentes lors du sacrifice des animaux par perfusion intracardiaque. Certaines équipes n'anesthésient pas les animaux mais procèdent à une décapitation ou dislocation rapide afin de sacrifier les animaux et ne pas affecter la phosphorylation de tau. Nous avons fait le choix d'anesthésier les animaux, tout en les maintenant sur tapis chauffant (sauf pour les animaux exposés à 4°C), afin de perfuser les animaux et de retirer le sang des vaisseaux sanguins. En effet, les anticorps de souris peuvent réagir avec les immunoglobulines de souris restantes dans les tissus des animaux lors de la méthode de Western Blot ou d'immunohistofluorescence (Petry et al., 2014). Néanmoins, il est possible de s'affranchir de ce risque de non spécificité des anticorps en utilisant des anticorps secondaires dirigés contre les chaînes légères des immunoglobulines.

Finalement, une question qui est souvent revenue lors de nos investigations est de savoir si la température du cerveau diminue lors des expositions au froid ou autre traitement induisant une hypothermie. Pour répondre à cette question, il faudrait mesurer la température du cerveau en utilisant des sondes de télémétrie implantées sur le crâne de l'animal (DeBow and Colbourne, 2003). Toutefois, cette méthode très invasive nécessite une chirurgie, et donc une anesthésie prolongée, et induit une inflammation au niveau de l'insertion de la sonde, qui pourrait également influencer nos résultats. Néanmoins, puisque la température du cerveau est extrêmement bien régulée grâce au flux sanguin cérébral, certaines études montrent que la température cérébrale fluctue de façon très similaire à la température corporelle, et que la mesure abdominale reflète relativement bien les variations cérébrales (Ootsuka et al., 2009; 2011).

## **2.2 La thermorégulation dans les études chez le rongeur**

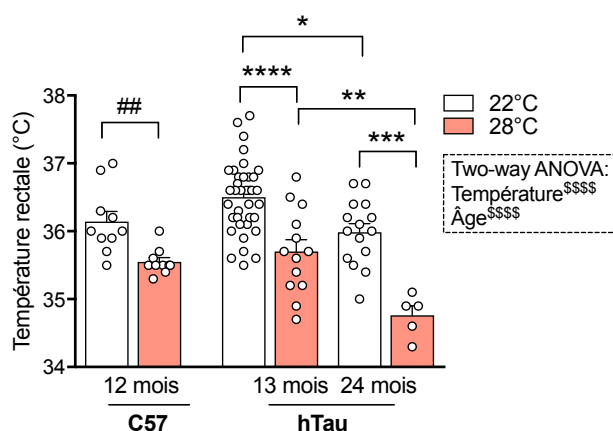
La thermorégulation chez le rongeur est différente de celle de l'humain et fait intervenir différents paramètres. Dans nos études, nous nous sommes limités à des mesures de température corporelle (par sonde rectale

dans les deux premiers chapitres, puis par télémétrie dans la dernière étude) et d'analyses biochimiques du TAB (UCP1 et R $\beta$ 3A principalement). Un élément important de la thermorégulation chez le rongeur que nous n'avons pas exploré ici est la diffusion de chaleur, principalement au niveau de la queue de la souris. Nous aurions pu mesurer les variations de température à l'aide d'une caméra thermique au niveau de la queue des animaux afin de déterminer si l'animal a une moins grande perte de chaleur en réponse aux traitements par exemple (Meyer et al., 2017; Reimúndez et al., 2018). Les variations thermiques peuvent également être évaluées au niveau du TAB interscapulaire et donnent un indice de l'activité thermogène de celui-ci (T. D. Müller et al., 2013; Warner et al., 2013). Finalement, la technique d'imagerie TEP-CT après injection de <sup>18</sup>F-FDG est réalisable chez le rongeur et donne une meilleure idée de l'activité du TAB par la mesure de l'utilisation du glucose dans ce tissu (Coleman et al., 2017; Labbé et al., 2016).

Dans notre troisième étude, nous avons mesuré la température des souris par télémétrie. Cette méthode est idéale pour obtenir un suivi continu de la température corporelle des animaux à distance, et donc sans biais de manipulation (Chapon et al., 2012; Clement et al., 1989; Tokizawa et al., 2015). Cela permet également de visualiser le rythme circadien des animaux et d'obtenir non seulement des informations sur la température moyenne des animaux, mais également sur l'amplitude de variation de température et la durée des phases (en grande partie guidée par les cycles de lumière de la salle d'hébergement). Ainsi, toutes ces informations permettent une comparaison plus fine des différents groupes qu'une seule mesure ponctuelle. Cette mesure aurait pu être couplée à un suivi de l'activité locomotrice, nous permettant de mieux interpréter les variations de température en fonction d'une hyperactivité ou hypoactivité des animaux (Grosbellet et al., 2016; Knight et al., 2013; Tokizawa et al., 2015). Nous avons tout de même réalisé un test d'exploration en champs libre ou *open field*, dans lequel nous n'avons observé aucune différence de locomotion entre les groupes sur une courte période d'une heure. Par ailleurs, la télémétrie nous a permis de constater que les tests comportementaux réalisés pendant la période diurne, et donc la phase de sommeil des souris, perturbent grandement les cycles circadiens. On peut considérer que ceci correspond à de la privation de sommeil, un stress très important pour les souris ayant des répercussions majeures sur le fonctionnement cérébral (Florian et al., 2011; Tononi and Cirelli, 2014). Ainsi, réaliser les tests comportementaux dans la phase nocturne, c'est-à-dire d'activité des animaux, devrait être la norme et non l'exception dans les études comportementales.

La question de la température d'hébergement s'est régulièrement posée dans la planification de nos expériences. En effet, plusieurs études montrent que la température de 22-23°C, la plus répandue dans les animaleries, est adaptée pour les expérimentateurs mais pas pour la souris : elle serait trop froide pour ces rongeurs dont la zone de thermoneutralité se situe davantage autour des 28-30°C (Cannon and Nedergaard, 2010; Gordon et al., 1998; Karp, 2012). Toutefois, cette idée ne fait pas l'unanimité auprès de la communauté scientifique (Speakman and Keijer, 2013). Les résultats de notre équipe montrent qu'une semaine à 28°C

augmente la température corporelle des 3xTg-AD de 20 mois de 0,5°C et améliore les déficits cognitifs et la pathologie amyloïde (Vandal et al., 2016). Bien qu'une semaine à 28°C semble être bénéfique pour les souris 3xTg-AD, cet effet pourrait être seulement temporaire. En effet, l'exposition à une température élevée inhibe la thermogénèse du TAB et sa stimulation sympathique (Cui et al., 2016). Ainsi, il est imaginable que le maintien à long terme (plus d'une semaine) des animaux âgés et présentant un déficit de thermorégulation induira au contraire une baisse de la capacité de thermogénèse sans frissons et éventuellement une hypothermie. Cette hypothèse est soutenue par des résultats de nos collaborateurs (équipe du Dr Planel) montrant qu'exposer des souris âgées non transgéniques (C57) ou hTau (exprimant la protéine tau humaine non mutée) à 28°C sur une période d'un mois induit finalement une hypothermie (Figure C2). Ceci aurait donc pu biaiser nos mesures de métabolisme périphérique, de phosphorylation de la protéine tau et rendre difficile la comparaison avec de précédentes études.

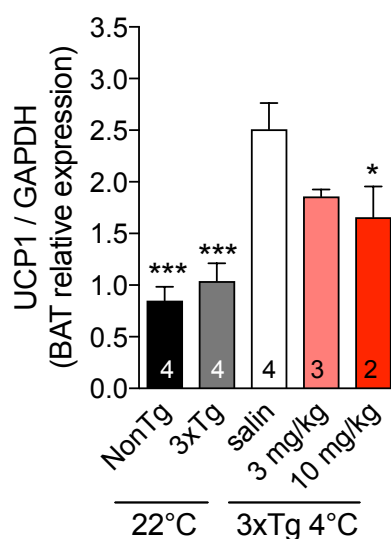


**Figure C2. Effet de l'exposition d'un mois à 28°C sur la température corporelle des souris âgées.**

Des souris C57 de 12 mois et des hTau de 13 et 24 mois ont été exposées à une température de 22°C ou 28°C pendant un mois et leur température rectale a été mesurée. *Données non publiées et recueillies par Dre Anastasia Noël lors de son post-doctorat dans l'équipe du Dr Emmanuel Planel.* Statistiques : test de Student non apparié : ## $p < 0.01$ ; ANOVA à un facteur : \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ANOVA à deux facteurs : \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Une question qui découle de nos travaux est de savoir quel serait l'effet d'une abolition totale de la thermogénèse du TAB sur la pathologie Alzheimer. La dénervation du TAB de façon bilatérale nous

permettrait de répondre en partie à cette question, mais aussi de confirmer le rôle de ce tissu sur la neuropathologie Alzheimer (Festuccia et al., 2010; Labbé et al., 2018; Vaughan et al., 2014). L'administration d'un antagoniste des R $\beta$ 3A est une alternative à la dénervation chirurgicale du TAB que nous avons testée (Figure C3). Toutefois, les résultats ne montrent qu'une faible diminution de l'expression d'UCP1 par la plus haute dose d'antagoniste (10 mg/kg) en condition d'exposition au froid chez la souris 3xTg-AD de 12 mois. Nous n'avons cependant pas testé l'administration de l'antagoniste en condition basale, c'est-à-dire sans stimulation de la thermogenèse du TAB par le froid, ni l'effet à long terme de ce traitement. Il semble tout de même que la dénervation du TAB représente une meilleure approche afin d'abolir complètement toute activité thermogénique du TAB dépendante de l'innervation sympathique.



**Figure C3. Effet de l'antagoniste des récepteurs  $\beta$ 3 adrénergiques SR 59230A sur l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun chez la 3xTg-AD de 12 mois exposée au froid.**

Des souris 3xTg-AD ont été exposées à 4°C (blanc) ou à 22°C (gris) pendant 24 heures. Un groupe de souris exposées au froid a reçu le SR 59230A à une dose de 3 mg/kg (rose) ou 10 mg/kg (rouge) à raison d'une injection toutes les deux heures pendant les 24 heures d'exposition; la dernière injection ayant lieu 5 minutes avant le sacrifice des animaux. Un groupe de souris non-transgéniques (NonTg, noir) est resté à 22°C. À la fin de l'exposition, les souris ont été sacrifiées par perfusion intracardiaque à leur température respective et le TAB a été prélevé. L'expression d'UCP1 et GAPDH ont été mesurées par qPCR dans le TAB. Les souris à 22°C ainsi qu'un groupe (salin) à 4°C ont reçu du salin. Statistiques : ANOVA à un facteur, test post-hoc de Dunnet (différence par rapport au groupe de référence 3xTg-AD salin 4°C) : \*p<0.05; \*\*\*p<0.001.

Nous avons observé une augmentation des marqueurs de thermogenèse du TAB en réponse aux expositions répétées au froid et aux injections d'agoniste des R $\beta$ 3A chez des souris âgées de 16 mois. Bien que des études montrent qu'il est possible de stimuler l'activité du TAB chez l'humain (Cypess et al., 2015; Hanssen et al., 2015a), nos résultats ne sont probablement pas entièrement transposables à l'Homme car la thermorégulation du rongeur et de l'humain sont très différentes. Par exemple, la quantité de TAB chez la souris représente 0,8% de son poids total (environ 150 mg pour une souris jeune de 20 g), contre seulement 0,1% pour un humain de 80 kg (si l'on estime à 100 g de TAB) (Carpentier et al., 2018; U Din et al., 2016), bien que cette valeur soit très variable d'un individu à l'autre. D'autre part, le métabolisme basal de la souris est 10 fois supérieur à celui de l'Homme. Également, le flux sanguin au niveau du TAB en condition d'exposition au froid chez la souris est près de 100 fois supérieur à celui observé chez l'humain (D. O. Foster and Frydman, 1979). Finalement, l'amplitude de variation de la température corporelle au cours d'une journée de 24 heures est de l'ordre de 3°C chez la souris contre 1,5°C chez l'humain (Gordon, 2017). Ainsi, bien que des expositions au froid répétées ne soient évidemment pas envisageables en clinique, surtout sur des personnes âgées, des études cliniques supplémentaires sur une population âgée sont nécessaires afin de déterminer si l'approche pharmacologique serait transposable en clinique. En effet, les études évaluant la quantité et l'activité du TAB par imagerie chez les personnes âgées de plus de 60 ans manquent. Il serait également intéressant d'évaluer ces paramètres après l'administration d'un agoniste des R $\beta$ 3A.

## **2.3 Les altérations métaboliques et la MA**

La souris 3xTg-AD est un modèle de choix pour étudier le lien entre altérations métaboliques et MA. Bien que les déficits métaboliques soient moins importants chez les souris 3xTg-AD mâles par rapport aux femelles (Vandal et al., 2015b), nous avons choisi d'utiliser uniquement des mâles dans la dernière étude afin de s'affranchir du biais du cycle œstral des femelles sur la température corporelle. Dans le deuxième chapitre, nous avons exposé les animaux à une diète enrichie en gras à 20% (w/w) afin d'augmenter leurs troubles métaboliques. Cette diète représente davantage les niveaux de gras consommés par un humain dans les pays occidentaux, mais n'est pas une diète très riche en gras induisant une importante obésité et un phénotype diabétique comme celle riche en gras à 35% (w/w) (Vandal et al., 2014b).

Afin de connaître l'effet de nos expérimentations sur la dépense énergétique totale de nos animaux dans les deux derniers chapitres, nous avons suivi le poids et la consommation de nourriture des animaux de façon régulière, donnant une indication de la quantité d'énergie consommée en réponse à notre traitement. Des

mesures de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte, comme cela a été fait dans notre article de 2016 (Vandal et al., 2016), pourraient compléter ces informations en vérifiant que la dépense énergétique est bien augmentée suite aux expositions répétées au froid et l'administration de l'agoniste. Nous avons observé une consommation de nourriture accrue chez les souris 3xTg-AD par rapport aux souris non-transgéniques dans le troisième chapitre, comme précédemment observé (Adebakin et al., 2012; K. Do et al., 2018). Cette hyperphagie peut suggérer une dépense énergétique augmentée des souris 3xTg-AD, compensée par une hausse de la prise alimentaire. Toutefois, nous avons précédemment montré que la dépense énergétique des souris 3xTg-AD de 12 mois était plus basse que les souris contrôles (Vandal et al., 2016). Une autre explication possible est que les souris 3xTg-AD présentent une dérégulation des hormones de la prise alimentaire, c'est-à-dire la leptine et la ghréline, ou dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. Une étude montre justement une réduction de leptine et ghréline plasmatiques de façon âge-dépendant chez la souris 3xTg-AD (Bonfili et al., 2017). D'autre part, certaines études suggèrent une résistance à la leptine dans le cerveau de patients décédés de la MA (Bonda et al., 2014; Harvey, 2010). Finalement, une étude a montré que la souris 3xTg-AD présente une réduction de l'*agouti related peptide* (*Agrp*) et du *melanocortin 4 receptor* (MC4R) dans l'hypothalamus à l'âge de 3 mois ainsi qu'une réduction du nombre de neurones pro-opiomélanocortine (POMC) (K. Do et al., 2018). Ainsi, des mesures additionnelles de ces hormones et récepteurs impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire dans notre dernière étude permettraient de confirmer cette hypothèse.

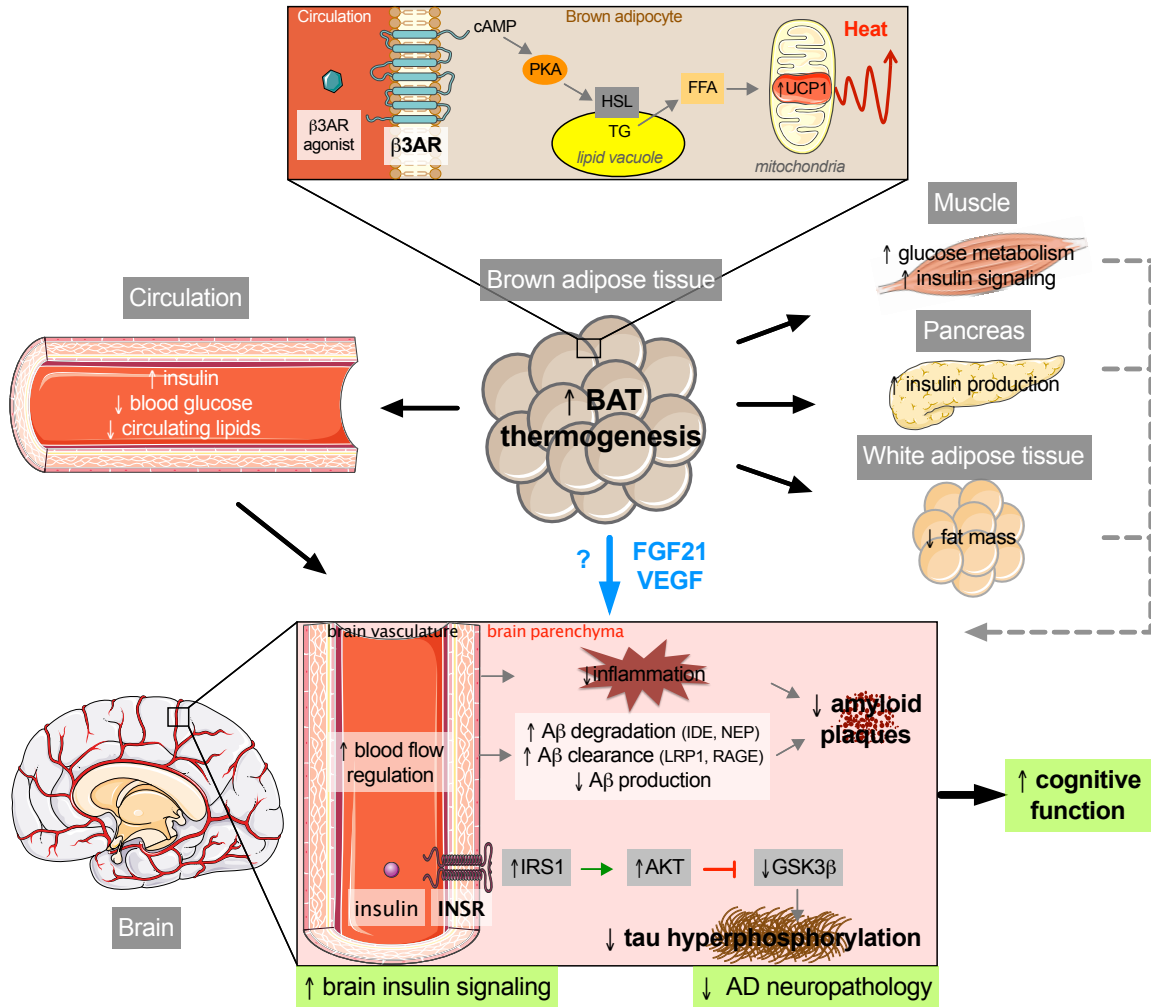
Les altérations métaboliques au niveau du SNC sont observées dans la MA (Arnold et al., 2018; Steen et al., 2005). Dans nos trois études, nous avons mesuré les principales protéines impliquées dans la cascade de la signalisation de l'insuline et dans la phosphorylation de tau dans le cerveau des souris par Western Blot : AKT (pSer427), GSK3 $\beta$  (pSer9, pTyr216), MAPK. Bien que certaines de ces kinases soient modulées en condition d'hypothermie, il est très difficile d'observer des changements d'activation de cette voie au niveau basal, c'est-à-dire sans stimulation à l'insuline. Afin de mettre en évidence un éventuel manque de réponse centrale à l'insuline, il serait intéressant d'administrer une dose élevée d'insuline (au moins 1 UI/kg) ou de salin quelques minutes avant de sacrifier les animaux (Vandal et al., 2014b). D'autre part, nous avons effectué ces mesures sur des homogénats totaux d'hippocampe. Or, pour étudier la réponse à l'insuline au niveau de l'interface entre le sang et le cerveau, c'est-à-dire au niveau des cellules endothéliales, il serait possible de réaliser des déplétions capillaires afin de mesurer ces protéines en Western Blot sur une fraction enrichie en vaisseaux sanguins cérébraux (Bourassa et al., 2019a; 2019b; Traversy et al., 2016; Woods et al., 2003). Pour ce qui est du métabolisme cérébral du glucose, nous avons mesuré les isoformes endothéliales et astrocytaires du récepteur GLUT1 par Western Blot et avons observé une diminution chez la 3xTg-AD de 16 mois par rapport aux NonTg, mais aucun effet de nos traitements. Pour savoir si le métabolisme du glucose cérébral est altéré, il serait fort intéressant de réaliser de l'imagerie  $^{18}\text{F}$ -FDG sur nos souris 3xTg-AD traitées et non traitées. En

effet, cette technique a permis de mettre en évidence une diminution du métabolisme du glucose dans différentes régions cérébrales de la souris 3xTg-AD, qui est surtout bien visible à l'âge de 18 mois (Nicholson et al., 2010). De plus, une diminution de la captation cérébrale du glucose a été montrée par la technique de perfusion cérébrale *in situ* (PCIS) dans des 3xTg-AD de 18 mois (T. M. Do et al., 2014). Cette technique consiste à perfuser une molécule marquée (ici le glucose) directement dans la carotide interne des souris anesthésiées afin de quantifier le passage de la molécule à travers la BHE (Alata et al., 2014). Ainsi, cette méthode permettrait de déterminer si la captation du glucose est modulée par nos traitements dans le cerveau des souris.

## **2.4 Mécanismes potentiels par lesquels la thermorégulation peut affecter la MA**

Nos travaux montrent pour la première fois que stimuler la thermorégulation du TAB permet de diminuer la neuropathologie de la MA dans un modèle murin. Toutefois, nous n'avons que peu investigué les mécanismes sous-jacents les liens entre thermorégulation et MA. Plusieurs pistes, qu'il serait intéressant d'investiguer dans nos prochains travaux, sont présentées ici (Figure C4).





**Figure C4. Mécanismes par lesquels l'activité de thermogénèse du tissu adipeux brun peut moduler la MA.**

L'activité de thermogénèse du TAB réduit les désordres métaboliques périphériques (résistance à l'insuline, hyperglycémie, hyperlipidémie) qui affectent la MA, tant au niveau de l'inflammation, de l'hyperphosphorylation de la protéine tau et des processus de production, de dégradation et de clairance des peptides amyloïdes. Réduire les altérations métaboliques périphériques par une stimulation de la thermogénèse pourrait aussi prévenir ou réduire la résistance centrale à l'insuline et améliorer le métabolisme cérébral du glucose. De plus, une meilleure régulation de la température corporelle protège contre l'hyperphosphorylation de la protéine tau et permet une meilleure régulation du flux sanguin, ce qui pourrait limiter les lésions cérébrovasculaires. Finalement, le TAB libère des batokines qui ont des effets neuroprotecteurs.

**Abréviations :**  $\beta$ 3AR:  $\beta$ 3 adrenergic receptor; AGL: acide gras libre; AKT: protein kinase B (PKB); AMPc: adénosine monophosphate cyclique; FGF21: fibroblast growth factor 21; GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase

*3β*; *INSR*: insulin receptor; *IDE*: insulin degrading enzyme; *IRS1*: insulin receptor substrate 1; *LHS*: lipase hormonosensible; *LRP1*: low density lipoprotein receptor-related protein 1; *NE*: norépinephrine; *NEP*: neprylisin; *PKA*: protéine kinase A; *RAGE*: receptor of advanced glycated endproduct; *TG*: triglycérides; *UCP1*: uncoupling protein 1; *VEGF*: vascular endothelial growth factor.

Nos différentes études montrent clairement qu'une diminution de la température corporelle, induite par des expositions aiguës au froid par exemple, aggrave la neuropathologie de la MA. Une meilleure capacité de thermorégulation pourrait donc prévenir l'hypothermie et ainsi limiter l'hyperphosphorylation de la protéine tau, comme le démontre notre deuxième chapitre. Toutefois, le lien direct entre température corporelle, thermorégulation et mémoire reste à élucider. Nos précédents travaux montrent qu'augmenter la température corporelle de 0,5°C permet de diminuer les déficits mnésiques des souris 3xTg-AD de 20 mois (Vandal et al., 2016). De façon surprenante, dans notre dernière étude, nous avons observé une corrélation positive relativement forte entre la quantité d'UCP1 dans le TAB et le pourcentage d'augmentation du score au test de reconnaissance d'objet chez les souris transgéniques spécifiquement. Ceci soutient l'hypothèse qu'une augmentation d'activité de thermogenèse du TAB est impliquée dans l'amélioration mnésique suite à l'administration d'un agoniste des R $\beta$ 3A, et qu'elle est bénéfique spécifiquement pour les souris 3xTg-AD.

Un mécanisme bien connu pour lier température corporelle et phosphorylation de tau est l'activité des kinases et phosphatases comme mentionné plus haut (Planel et al., 2001). Les altérations métaboliques, qui peuvent être corrigées par la stimulation du TAB, peuvent également influencer la phosphorylation de tau via l'activité des kinases. En effet, GSK3 $\beta$  est la principale kinase impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau (Hooper et al., 2008). Plusieurs études proposent que la résistance à l'insuline diminue l'activation de la voie PI3K/AKT, qui inhibe GSK3 $\beta$  (en augmentant sa phosphorylation sur le site Ser9), et donc finalement conduit à une plus grande activité de cette dernière et une hyperphosphorylation de tau (Gratuze et al., 2018; Griffin et al., 2005; Jolivald et al., 2008; Qu et al., 2011). Ainsi, une meilleure réponse centrale à l'insuline permettrait de diminuer la phosphorylation de tau. Certains travaux montrent que l'administration d'insuline dans des modèles animaux de la MA permet de diminuer l'hyperphosphorylation de tau (Chen et al., 2014a; Gratuze et al., 2017b), même dans la fraction insoluble correspondant aux protéines tau agrégées (résultats supplémentaires : (Vandal et al., 2014b)). D'ailleurs, l'administration du CL-316,243 induit une importante sécrétion d'insuline (Atef et al., 1996; MacPherson et al., 2014). Il est donc envisageable que les effets bénéfiques de l'agoniste des R $\beta$ 3A sur la neuropathologie de la MA et la mémoire soient en partie dus à la libération d'insuline dans la circulation.

Les résultats des Chapitres 2 et 3 confirment que la stimulation du TAB, que ce soit par les expositions répétées au froid ou par l'administration du CL-316,243, permet d'améliorer la tolérance au glucose des souris âgées. Comme mentionné en introduction, l'hyperglycémie chronique augmente la neuropathologie de la MA dans des modèles animaux de la maladie (Gratuze et al., 2017b; Guo et al., 2016; Kim et al., 2013). De plus, le diabète induit des lésions vasculaires importantes (Sonnen et al., 2009). Réduire l'intolérance au glucose induite par une diète riche en gras par un régime hypocalorique permet de réduire la pathologie amyloïde et la neuroinflammation chez la souris APP/PS1 (Walker et al., 2017). Ainsi, une plus importante activité de thermogenèse du TAB pourrait être protectrice contre les effets néfastes de l'hyperglycémie sur le cerveau.

De manière générale, les altérations métaboliques périphériques induisent également une augmentation de la neuroinflammation et du stress oxydatif, qui sont associés à la MA et principalement à la pathologie amyloïde (De Felice and Ferreira, 2014; Theriault et al., 2016; Verdile et al., 2015). Bien que nous n'ayons pas étudié ces aspects dans nos études, il est possible que nos traitements permettent de diminuer la neuroinflammation et le stress oxydatif dans le cerveau des souris 3xTg-AD âgées. En effet, nous avons observé une diminution de l'intolérance au glucose et des triglycérides plasmatiques dans le Chapitre 2, et une diminution du poids et une meilleure tolérance au glucose dans le Chapitre 3.

La régulation de la température corporelle est intimement liée à la pression sanguine. En effet, la vasodilatation permet de diminuer la température corporelle par diffusion de la chaleur, et à l'inverse, la vasoconstriction des vaisseaux permet de limiter les pertes de chaleur en condition de froid, et de diffuser plus rapidement la chaleur produite par la thermogenèse (Smith and Johnson, 2016). De plus, l'activité accrue du TAB suite à une stimulation par le froid induit une augmentation du flux sanguin au niveau local (Baron et al., 2012; Orava et al., 2011). Il est bien connu maintenant que le flux sanguin cérébral affecte l'activité neuronale, le métabolisme et les fonctions cérébrales (Iadecola, 2017). Mais surtout, des dysfonctions dans le couplage neurovasculaire ont été identifiées dans la MA (Bell and Zlokovic, 2009; Hamel et al., 2016), et sont également observées chez la souris 3xTg-AD (Lourenço et al., 2017). Afin de vérifier si la stimulation du TAB permet une meilleure régulation du débit sanguin cérébral, ce paramètre pourrait être mesuré en réponse à une exposition au froid ou à l'administration de l'agoniste R $\beta$ 3A grâce à la méthode du *laser doppler* (Nicolakakis et al., 2008). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite un amincissement du crâne des souris et surtout leur anesthésie, qui peut influencer également la régulation du flux sanguin. En revanche, de nouvelles méthodes d'imagerie du flux sanguin cérébral par ultrasons (*fUS imaging*) sur souris vigiles ont été développées et permettraient de suivre l'évolution du débit sanguin cérébral tout au long de nos traitements et à différents âges (Deffieux et al., 2018; Tiran et al., 2017).

Un autre mécanisme reliant thermogénèse du TAB et MA pourrait être la sécrétion de batokines (Villarroya et al., 2017). En effet, nous avons observé une augmentation de FGF21 dans le plasma des souris ayant reçu les expositions répétées au froid, et ces niveaux étaient corrélés négativement à la phosphorylation de tau dans l'hippocampe de ces souris. Cette deuxième étude soulève la question de savoir si FGF21 peut exercer directement un effet sur la phosphorylation de tau dans l'hippocampe. Pour appuyer cette hypothèse, quelques études suggèrent que FGF21 améliore la mémoire de souris obèses, protège contre la toxicité induite par les peptides A $\beta$ 42 *in vitro* et des lésions de la BHE (Amiri et al., 2018; Chen et al., 2018; Sa-Nguanmoo et al., 2016b; Q. Wang et al., 2018; Yu et al., 2018). De plus, une étude a montré que FGF21 pouvait traverser la BHE (Hsuchou et al., 2007) alors que son récepteur FGFR1 est présent au niveau cérébral, bien que son rôle soit peu connu pour le moment (Sun et al., 2007). Ainsi, il serait intéressant d'administrer FGF21 à des souris transgéniques et d'évaluer l'effet de ce traitement sur la mémoire et la neuropathologie de la MA.

D'autre part, le TAB sécrète le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) en condition de stimulation afin d'augmenter l'angiogenèse dans le tissu (S. Lim et al., 2012; Villarroya et al., 2017). Ce facteur de croissance est connu pour avoir des effets neuroprotecteurs (Storkebaum et al., 2004). Les niveaux de VEGF plasmatiques sont plus bas chez les sujets Alzheimer, et les quantités dans le LCR sont associées à l'atrophie de l'hippocampe et la mémoire chez des individus atteints de la MA (Hohman et al., 2015; Mateo et al., 2007). De plus, l'administration de VEGF permet de renverser les déficits cognitifs et d'augmenter les marqueurs cérébrovasculaires dans des souris diabétiques et un modèle murin de la MA (S. L. Taylor et al., 2015; P. Wang et al., 2011). Ainsi, la stimulation du TAB pourrait avoir un effet sur la mémoire et la protection de la vasculature cérébrale via la production de VEGF.

Notre troisième chapitre soulève la question de savoir si l'agoniste des R $\beta$ 3A a un effet direct au niveau du SNC ou si son action est exclusivement restreinte à la périphérie, plus précisément au niveau du TAB. En effet, il n'est pas exclu que l'agoniste ait un effet direct au niveau du SNC puisque certaines études montrent que le cerveau exprime, bien que faiblement, des R $\beta$ 3A (B. A. Evans et al., 1996; Summers et al., 1995). Les bases de données de *single-cell RNA sequencing* dans le cerveau de souris montrent également une expression très faible du gène *Adrb3* (Ye Zhang et al., 2014). L'administration de l'agoniste des R $\beta$ 3A à des souris ayant une délétion des R $\beta$ 3A spécifiquement sur les adipocytes ou dans le SNC permettrait de savoir si son action est exclusivement restreinte à la périphérie (plus précisément au niveau du TAB) ou non. Toutefois, il faudrait d'abord vérifier la localisation cellulaire de ces récepteurs dans le cerveau : sont-ils présents à la surface des cellules endothéliales, permettant une atteinte de la molécule présente dans le sang ? Ou bien sont-ils présents dans le parenchyme cérébral ? Dans ce deuxième cas, l'action de l'agoniste dans le SNC nécessiterait son passage à travers la BHE, passage restreint à de très petites molécules ou à celles

bénéficiant d'un transporteur spécifique (Pardridge, 2012). Bien que certains articles mentionnent que le CL-316,243 ne traverse pas la BHE, ceci pourrait être vérifié par l'injection intraveineuse de la molécule à des souris puis son dosage dans le cerveau par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplé à la spectrométrie de masse. D'autre part, la méthode de la PCIS permettrait de quantifier son taux de passage en  $\mu\text{L}$  par gramme de cerveau par seconde et de savoir si ce passage se fait grâce à un transporteur en faisant une expérience de saturation (St-Amour et al., 2013). Toutefois, cette dernière méthode nécessite d'avoir la molécule sous forme radio-marquée.

## 2.5 Études précliniques dans la MA

Travailler avec des modèles animaux présente plusieurs limitations pour la translation vers l'humain. Toutefois, les études précliniques sont obligatoires pour développer de nouveaux traitements et permettent de mieux comprendre certains aspects de la pathogenèse de la MA ainsi que les mécanismes d'action de diverses interventions. Travailler avec la souris 3xTg-AD comporte plusieurs limitations, comme tous les modèles animaux de la MA. La plus importante limitation est que cette souris est un modèle de la forme familiale et non de la forme sporadique de la MA. Comme il n'existe pour le moment aucun véritable modèle murin de la forme sporadique de la MA, les études précliniques dans la MA sont confrontées à cette limitation majeure. Une autre limite de la souris 3xTg-AD est qu'elle ne présente pas de mort neuronale malgré la présence des marqueurs neuropathologiques de la MA. Finalement, il s'agit d'un modèle de surexpression, qui présente ses désavantages, mais cette surexpression demeure dans les faits très progressive dans ce modèle. D'autre part, cette souris présente de nombreux avantages dans le cadre de nos études. Tout d'abord, elle présente à la fois les pathologies tau et amyloïde, permettant d'analyser l'effet de traitements sur les deux marqueurs neuropathologiques à la fois et leur interaction (G. S. Bloom, 2014; Oddo et al., 2003b; St-Amour et al., 2014). Cela nous a d'ailleurs permis de mettre en évidence que nos différentes approches n'ont pas les mêmes effets sur ces deux marqueurs neuropathologiques au sein d'un même modèle animal. De plus, il faut attendre au moins 8 à 10 mois avant d'observer des ENF de façon relativement répandue dans l'hippocampe ainsi que quelques plaques amyloïdes dans le subiculum des animaux (Belfiore et al., 2018). Ceci nous oblige à travailler avec des animaux âgés, ce qui a une répercussion majeure dans le coût de nos études ainsi que la planification des expérimentations à long terme, mais nous permet de prendre en compte le paramètre du vieillissement dans nos expérimentations. Comme le principal facteur de risque de la MA demeure l'âge avancé, travailler avec des animaux âgés est important dans les études précliniques. D'autre part, notre équipe a observé plusieurs altérations métaboliques chez la 3xTg-AD (Vandal et al., 2015b; 2014b), mais surtout un déficit de thermorégulation (Vandal et al., 2016), faisant de ce modèle un très bon

choix pour nos études. Toutefois, il serait intéressant de reproduire nos résultats dans d'autres modèles de la MA. Puisque nous avons obtenu des résultats sur le comportement et la pathologie amyloïde, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'agoniste des R $\beta$ 3A dans un modèle de pathologie amyloïde pure, et non induit par des mutations génétiques, comme une souris ayant reçu des injections de peptides A $\beta$  directement dans l'hippocampe (Brouillette et al., 2012; Shankar et al., 2008).

Nous avons montré pour la première fois qu'un agoniste des R $\beta$ 3A exerçait des effets bénéfiques chez la souris 3xTg-AD de 16 mois après un mois de traitement. Puisque la pathologie et les déficits comportementaux apparaissent dès l'âge de 12 mois, et que nous avons administré le traitement de 15 à 16 mois, notre étude avait pour but de vérifier si cette molécule pouvait avoir un effet thérapeutique en ralentissant la progression ou en réduisant la pathologie dans un modèle murin de la MA. Il serait intéressant de déterminer l'effet de cet agoniste selon différents paradigmes expérimentaux (Shineman et al., 2011). Par exemple, l'agoniste pourrait être administré dans le stade « pré-symptomatique » chez la souris 3xTg-AD (dès l'âge de 6 mois par exemple), afin d'évaluer son potentiel en prévention. D'autre part, les animaux pourraient être sacrifiés après une période de « *wash-out* » d'un mois ou plus afin de vérifier si le traitement a des effets à long terme (Flores et al., 2018).

Au niveau comportemental, nos résultats ont permis de mettre en évidence une amélioration de la mémoire de reconnaissance induite par le traitement avec l'agoniste grâce au test de reconnaissance d'objet. Ce test est approprié pour la souris 3xTg-AD âgée car il induit peu de stress, représente une tâche relativement facile (dans le cas d'un délai d'une heure entre les deux phases de test) et est assez sensible pour détecter des déficits mnésiques dès l'âge de 12 mois. Toutefois, nous aurions pu vérifier l'effet de notre traitement sur la mémoire spatiale telle qu'évaluée par le test du Y-Maze, qui est un test induisant peu de stress et relativement rapide à effectuer également, un critère important dans la mesure où nous avons effectué un traitement pharmacologique d'un mois seulement (Wolf et al., 2016). Le labyrinthe radial à 8 bras et le test de la piscine de Morris mesurent la mémoire spatiale à long terme, mais nécessitent plusieurs journées d'expérimentation (Puzzo et al., 2014). De plus, le test de la piscine de Morris implique de placer les animaux dans l'eau, certes à température contrôlée, mais aurait interféré avec les mécanismes naturels de thermorégulation de nos animaux.

Globalement, il existe assez peu de translation des résultats obtenus chez la souris vers l'humain, surtout dans le domaine de la MA. Dans notre cas, la translation de nos résultats de la souris vers l'Homme pourrait être relativement rapide car un agoniste des R $\beta$ 3A, le mirabegron, est déjà utilisé en clinique. De plus, des études cliniques pour une utilisation thérapeutique de ce médicament dans le diabète et l'obésité sont en cours (NCT02811289; NCT03012113). Bien que le mirabegron soit sécuritaire et efficace pour le traitement de

la vessie hyperactive chez les personnes âgées (Chapple and Siddiqui, 2017), il reste à déterminer s'il pourrait être efficace pour activer le TAB dans une population âgée. Des études longitudinales évaluant l'incidence de MA dans une population recevant le mirabegron pourraient aider à évaluer l'intérêt d'un tel traitement dans la maladie. Dans le cadre de la MA, ce traitement pourrait bénéficier plus spécifiquement à une sous-population ayant un déficit de thermorégulation ou des maladies métaboliques.

### **3 Conclusion générale**

La MA est une maladie neurodégénérative qui affecte un nombre considérable de personnes âgées à travers le monde. Elle représente aujourd'hui un problème de santé publique majeur pour nos sociétés. Malheureusement, il n'existe pour le moment aucun traitement curatif pour la MA et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques stagne depuis plusieurs années. Plusieurs raisons expliquent ces lacunes : l'hétérogénéité des patients, les causes exactes de la maladie demeurent inconnues, le manque de modèles animaux et de biomarqueurs fiables. Pour réellement faire avancer la recherche sur la MA, il est nécessaire de sortir des sentiers battus et d'explorer de nouvelles pistes.

L'objectif de cette thèse était de déterminer si la thermorégulation pouvait être une cible thérapeutique intéressante dans la MA. Nous avons investigué une piste originale et très peu étudiée dans le domaine. Ensemble, nos données démontrent que les interventions visant à stimuler la thermogenèse permettent à la fois de contrer l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite par une hypothermie, de diminuer la pathologie amyloïde et d'améliorer les déficits cognitifs dans un modèle murin de la MA. De manière plus générale, les travaux issus de cette thèse montrent que moduler la thermorégulation permet d'atténuer la neuropathologie et les symptômes de la MA. Ainsi, nos résultats présentent la thermorégulation comme une nouvelle cible thérapeutique et ouvrent la voie à de nouvelles stratégies pour cette maladie, un enjeu crucial pour la découverte de traitements innovants.

Ces résultats inciteront peut-être d'autres équipes à étudier les mécanismes reliant la thermorégulation à la MA, que ce soit chez l'animal ou l'humain. Des études cliniques chez l'Homme sont cruciales pour confirmer l'efficacité de telles interventions dans la MA. Malgré cela, cette piste semble prometteuse car elle permet de cibler plusieurs altérations périphériques et centrales survenant dans la MA en même temps.

# Bibliographie

- Abbondante, S., Baglietto-Vargas, D., Rodriguez-Ortiz, C.J., Estrada-Hernandez, T., Medeiros, R., LaFerla, F.M., 2014. Genetic ablation of tau mitigates cognitive impairment induced by type 1 diabetes. *The American Journal of Pathology* 184, 819–826. doi:10.1016/j.ajpath.2013.11.021
- Abe, J., Okazawa, M., Adachi, R., Matsumura, K., Kobayashi, S., 2003. Primary cold-sensitive neurons in acutely dissociated cells of rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 342, 29–32.
- Adebakin, A., Bradley, J., Gümüşgöz, S., Waters, E.J., Lawrence, C.B., 2012. Impaired satiation and increased feeding behaviour in the triple-transgenic Alzheimer's disease mouse model. *PLoS ONE* 7, e45179. doi:10.1371/journal.pone.0045179
- Adzovic, L., Lynn, A.E., D'Angelo, H.M., Crockett, A.M., Kaercher, R.M., Royer, S.E., Hopp, S.C., Wenk, G.L., 2015. Insulin improves memory and reduces chronic neuroinflammation in the hippocampus of young but not aged brains. *J Neuroinflammation* 12, 63. doi:10.1186/s12974-015-0282-z
- Ahn, B.-H., Kim, H.-S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.-X., Finkel, T., 2008. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14447–14452. doi:10.1073/pnas.0803790105
- Alata, W., Paris-Robidas, S., Emond, V., Bourasset, F., Calon, F., 2014. Brain uptake of a fluorescent vector targeting the transferrin receptor: a novel application of in situ brain perfusion. *Mol. Pharm.* 11, 243–253. doi:10.1021/mp400421a
- Alata, W., Ye, Y., St-Amour, I., Vandal, M., Calon, F., 2015. Human apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 86–94. doi:10.1038/jcbfm.2014.172
- Allan, L.M., Rowan, E.N., Firbank, M.J., Thomas, A.J., Parry, S.W., Polvikoski, T.M., O'Brien, J.T., Kalaria, R.N., 2011. Long term incidence of dementia, predictors of mortality and pathological diagnosis in older stroke survivors. *Brain* 134, 3716–3727. doi:10.1093/brain/awr273
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R.A., Ghetti, B., Spillantini, M.G., Goedert, M., 2002. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22, 9340–9351.
- Alonso, A.D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C.P., Alaniz, M.E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2010. Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 285, 30851–30860. doi:10.1074/jbc.M110.110957
- Alzheimer's association, 2018. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 14, 367–429.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., Murtagh, F.R., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"., *Clinical anatomy* (New York, N.Y.). Wiley-Blackwell. doi:10.1002/ca.980080612
- Amir, S., Schiavetto, A., 1990. Injection of prostaglandin E2 into the anterior hypothalamic preoptic area activates brown adipose tissue thermogenesis in the rat. *Brain Res.* 528, 138–142.
- Amiri, M., Braidy, N., Aminzadeh, M., 2018. Protective Effects of Fibroblast Growth Factor 21 Against Amyloid-Beta1-42-Induced Toxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res* 34, 574–583. doi:10.1007/s12640-018-9914-2
- An, Y., Varma, V.R., Varma, S., Casanova, R., Dammer, E., Pletnikova, O., Chia, C.W., Egan, J.M., Ferrucci, L., Troncoso, J., Levey, A.I., Lah, J., Seyfried, N.T., Legido-Quigley, C., O'Brien, R., Thambisetty, M., 2018. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14, 318–329. doi:10.1016/j.jalz.2017.09.011
- Anand, R., Gill, K.D., Mahdi, A.A., 2014. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 27–50. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.004
- Ancelin, M.L., de Roquefeuil, G., Ledésert, B., Bonnel, F., Cheminal, J.C., Ritchie, K., 2001. Exposure to anaesthetic agents, cognitive functioning and depressive symptomatology in the elderly. *Br J Psychiatry*



178, 360–366.

- Andersen, B., Omar, B.A., Rakipovski, G., Raun, K., Ahrén, B., 2015. Fibroblast growth factor 21 prevents glycemic deterioration in insulin deficient mouse models of diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 764, 189–194. doi:10.1016/j.ejphar.2015.07.003
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K.L., Barde, Y.-A., Duff, K., Davies, P., 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry* 86, 582–590.
- Andrews-Zwilling, Y., Bien-Ly, N., Xu, Q., Li, G., Bernardo, A., Yoon, S.Y., Zwilling, D., Yan, T.X., Chen, L., Huang, Y., 2010. Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. *J Neurosci* 30, 13707–13717. doi:10.1523/JNEUROSCI.4040-10.2010
- Anstey, K.J., Sanden, von, C., Salim, A., O'Kearney, R., 2007. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Epidemiol.* 166, 367–378. doi:10.1093/aje/kwm116
- Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13, 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
- Arch, J.R.S., 2011. Challenges in  $\beta(3)$ -Adrenoceptor Agonist Drug Development. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2, 59–64. doi:10.1177/2042018811398517
- Arendt, T., 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118, 167–179. doi:10.1007/s00401-009-0536-x
- Arendt, T., 2003. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog. Neurobiol.* 71, 83–248.
- Arendt, T., Bullmann, T., 2013. Neuronal plasticity in hibernation and the proposed role of the microtubule-associated protein tau as a “master switch” regulating synaptic gain in neuronal networks. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R478–89. doi:10.1152/ajpregu.00117.2013
- Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A.M., Hut, R.A., Rüdiger, J., Van der Zee, E.A., Harkany, T., Holzer, M., Härtig, W., 2003. Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* 23, 6972–6981.
- Arevalo, M.-A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 17–29. doi:10.1038/nrn3856
- Arevalo-Rodriguez, I., Smailagic, N., Roqué I Figuls, M., Ciapponi, A., Sanchez-Perez, E., Giannakou, A., Pedraza, O.L., Bonfill Cosp, X., Cullum, S., 2015. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of Alzheimer's disease and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev* 25, CD010783. doi:10.1002/14651858.CD010783.pub2
- Arnold, S.E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S.L., Koenig, A.M., Wang, H.-Y., Ahima, R.S., Craft, S., Gandy, S., Buettner, C., Stoeckel, L.E., Holtzman, D.M., Nathan, D.M., 2018. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol* 14, 168–181. doi:10.1038/nrneurol.2017.185
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631–639.
- Arsenault, D., Julien, C., Tremblay, C., Calon, F., 2011. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS One* 6, e17397. doi:10.1371/journal.pone.0017397
- Asuni, A.A., Boutajangout, A., Quartermain, D., Sigurdsson, E.M., 2007. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 27, 9115–9129. doi:10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007
- Atef, N., Lafontan, M., Doublé, A., Hélar, C., Ktorza, A., Pénicaud, L., 1996. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 298, 287–292.
- Atgié, C., D'Allaire, F., Bukowiecki, L.J., 1997. Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol.* 273, C1136–42.

- Attems, J., Jellinger, K., Thal, D.R., Van Nostrand, W., 2011. Review: sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 75–93. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01137.x
- Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., Hyman, B.T., 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103, 26–35.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., Hernández, F., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84, 361–384. doi:10.1152/physrev.00024.2003
- Åberg, D., Johansson, P., Isgaard, J., Wallin, A., Johansson, J.-O., Andreasson, U., Blennow, K., Zetterberg, H., Åberg, N.D., Svensson, J., 2015. Increased Cerebrospinal Fluid Level of Insulin-like Growth Factor-II in Male Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 48, 637–646. doi:10.3233/JAD-150351
- Baglietto-Vargas, D., Shi, J., Yaeger, D.M., Ager, R., LaFerla, F.M., 2016. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neurosci Biobehav Rev* 64, 272–287. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.03.005
- Bal, N.C., Maurya, S.K., Sopariwala, D.H., Sahoo, S.K., Gupta, S.C., Shaikh, S.A., Pant, M., Rowland, L.A., Bombardier, E., Goonasekera, S.A., Tupling, A.R., Molkentin, J.D., Periasamy, M., 2012. Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat. Med.* 18, 1575–1579. doi:10.1038/nm.2897
- Baron, D.M., Clerte, M., Brouckaert, P., Raheer, M.J., Flynn, A.W., Zhang, H., Carter, E.A., Picard, M.H., Bloch, K.D., Buys, E.S., Scherrer-Crosbie, M., 2012. In vivo noninvasive characterization of brown adipose tissue blood flow by contrast ultrasound in mice. *Circ Cardiovasc Imaging* 5, 652–659. doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.975607
- Bartness, T.J., Song, C.K., Demas, G.E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J. Biol. Rhythms* 16, 196–204.
- Baskin, A.S., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Anflick-Chames, E., Cero, C., Johnson, J.W., O'Mara, A.E., Fletcher, L.A., Leitner, B.P., Duckworth, C.J., Huang, S., Cai, H., Garraffo, H.M., Millo, C.M., Dieckmann, W., Tolstikov, V., Chen, E.Y., Gao, F., Narain, N.R., Kiebish, M.A., Walter, P.J., Herscovitch, P., Chen, K.Y., Cypess, A.M., 2018. Regulation of Human Adipose Tissue Activation, Gallbladder Size, and Bile Acid Metabolism by a  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes* db180462. doi:10.2337/db18-0462
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.-S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., Holtzman, D.M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P.S., Ghetti, B., Klunk, W.E., McDade, E., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J.M., Rossor, M.N., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Salloway, S., Morris, J.C., Dominantly Inherited Alzheimer Network, 2012. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 795–804. doi:10.1056/NEJMoa1202753
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., Oddo, S., 2018. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell* 12, e12873. doi:10.1111/ace1.12873
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., Berk, B.C., Zlokovic, B.V., 2012. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485, 512–516. doi:10.1038/nature11087
- Bell, R.D., Zlokovic, B.V., 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118, 103–113. doi:10.1007/s00401-009-0522-3
- Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H.L., Born, J., Kern, W., 2004. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1326–1334. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.04.003
- Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., Das, S.R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R.H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Thiagarajan, R.R., Reeves, M.J., Ritchey, M., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C.W., Turner, M.B., Virani, S.S., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, 2017. Heart

- Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, e146–e603. doi:10.1161/CIR.0000000000000485
- Bennett, D.A., Schneider, J.A., Arvanitakis, Z., Kelly, J.F., Aggarwal, N.T., Shah, R.C., Wilson, R.S., 2006. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66, 1837–1844. doi:10.1212/01.wnl.0000219668.47116.e6
- Bennett, Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Arnold, S.E., 2004. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch. Neurol.* 61, 378–384. doi:10.1001/archneur.61.3.378
- Benomar, Y., Amine, H., Crépin, D., Rifai, A., S., Riffault, L., Gertler, A., Taouis, M., 2016. Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. *Diabetes* 65, 913–926. doi:10.2337/db15-1029
- Bensalem, J., Servant, L., Alfos, S., Gaudout, D., Layé, S., Pallet, V., Lafenetre, P., 2016. Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice. *Front Behav Neurosci* 10, 9. doi:10.3389/fnbeh.2016.00009
- Bereczki, E., Bogstedt, A., Höglund, K., Tsitsi, P., Brodin, L., Ballard, C., Svenningsson, P., Aarsland, D., 2017. Synaptic proteins in CSF relate to Parkinson's disease stage markers. *NPJ Parkinsons Dis* 3, 7. doi:10.1038/s41531-017-0008-2
- Bereczki, E., Francis, P.T., Howlett, D., Pereira, J.B., Höglund, K., Bogstedt, A., Cedazo-Minguez, A., Baek, J.-H., Hortobágyi, T., Attems, J., Ballard, C., Aarsland, D., 2016. Synaptic proteins predict cognitive decline in Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Alzheimers Dement* 12, 1149–1158. doi:10.1016/j.jalz.2016.04.005
- Berlau, D.J., Corrada, M.M., Head, E., Kawas, C.H., 2009. APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology* 72, 829–834. doi:10.1212/01.wnl.0000343853.00346.a4
- Biessels, G.J., 2014. Capitalising on modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 13, 752–753. doi:10.1016/S1474-4422(14)70154-1
- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., Scheltens, P., 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5, 64–74. doi:10.1016/S1474-4422(05)70284-2
- Birks, J., 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD005593. doi:10.1002/14651858.CD005593
- Bisht, K., Sharma, K.P., Lecours, C., Gabriela Sánchez, M., Hajj, E., Milior, G., Olmos-Alonso, A., Gómez-Nicola, D., Luheshi, G., Vallières, L., Branchi, I., Maggi, L., Limatola, C., Butovsky, O., Tremblay, M.-É., 2016. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 64, 826–839. doi:10.1002/glia.22966
- Black, S., Gao, F., Bilbao, J., 2009. Understanding white matter disease: imaging-pathological correlations in vascular cognitive impairment. *Stroke* 40, S48–52. doi:10.1161/STROKEAHA.108.537704
- Blennow, K., Zetterberg, H., 2018. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J. Intern. Med.* 284, 643–663. doi:10.1111/joim.12816
- Blondin, D.P., Daoud, A., Taylor, T., Tingelstad, H.C., Bézaire, V., Richard, D., Carpentier, A.C., Taylor, A.W., Harper, M.-E., Aguer, C., Haman, F., 2017. Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. *J Physiol* 595, 2099–2113. doi:10.1113/JP273395
- Blondin, D.P., Labbé, S.M., Tingelstad, H.C., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, E.E., Carpentier, A.C., Richard, D., Haman, F., 2014. Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E438–46. doi:10.1210/jc.2013-3901
- Bloom, G.S., 2014. Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* 71, 505–508. doi:10.1001/jamaneurol.2013.5847
- Bloom, J.D., Dutia, M.D., Johnson, B.D., Wissner, A., Burns, M.G., Largis, E.E., Dolan, J.A., Claus, T.H., 1992. Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino] propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL 316,243). A potent beta-adrenergic agonist virtually specific for beta 3 receptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent. *J. Med. Chem.* 35, 3081–3084.

- Body temperature as a risk factor for Alzheimer's disease, 2000. *Body temperature as a risk factor for Alzheimer's disease* 55, 440–444. doi:10.1054/mehy.2000.1085
- Bonda, D.J., Stone, J.G., Torres, S.L., Siedlak, S.L., Perry, G., Kryscio, R., Jicha, G., Casadesus, G., Smith, M.A., Zhu, X., Lee, H.-G., 2014. Dysregulation of leptin signaling in Alzheimer disease: evidence for neuronal leptin resistance. *Journal of Neurochemistry* 128, 162–172. doi:10.1111/jnc.12380
- Bonfili, L., Cecarini, V., Berardi, S., Scarpona, S., Suchodolski, J.S., Nasuti, C., Fiorini, D., Boarelli, M.C., Rossi, G., Eleuteri, A.M., 2017. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Nature Publishing Group* 7, 2426. doi:10.1038/s41598-017-02587-2
- Bons, N., Rieger, F., Prudhomme, D., Fisher, A., Krause, K.-H., 2006. *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav.* 5, 120–130. doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00149.x
- Bookout, A.L., de Groot, M.H.M., Owen, B.M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Takahashi, J.S., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2013. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat. Med.* 19, 1147–1152. doi:10.1038/nm.3249
- Bories, C., Guitton, M.J., Julien, C., Tremblay, C., Vandal, M., Msaid, M., De Koninck, Y., Calon, F., 2012. Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease. 7, e46111. doi:10.1371/journal.pone.0046111
- Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G.P., Bickel, U., Fehm, H.L., 2002. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat. Neurosci.* 5, 514–516. doi:10.1038/nn849
- Bourassa, P., Alata, W., Tremblay, C., Paris-Robidas, S., Calon, F., 2019a. Transferrin Receptor-Mediated Uptake at the Blood-Brain Barrier Is Not Impaired by Alzheimer's Disease *Neuropathology*. *Mol. Pharm.* 16, 583–594. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00870
- Bourassa, P., Tremblay, C., Schneider, J.A., Bennett, Calon, F., 2019b. Beta-amyloid pathology in human brain microvessel extracts from the parietal cortex: relation with cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 76, 1479–24. doi:10.1007/s00401-019-01967-4
- Bourasset, F., Ouellet, M., Tremblay, C., Julien, C., Do, T.M., Oddo, S., LaFerla, F., Calon, F., 2009. Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 56, 808–813.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259.
- Braak, H., Thal, D.R., Ghebremedhin, E., Del Tredici, K., 2011. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 960–969. doi:10.1097/NEN.0b013e318232a379
- Bretteville, A., Marcouiller, F., Julien, C., El-Khoury, N.B., Petry, F.R., Poitras, I., Mouginot, D., Lévesque, G., Hébert, S.S., Planel, E., 2012. Hypothermia-induced hyperphosphorylation: a new model to study tau kinase inhibitors. *Nature Publishing Group* 2, 480. doi:10.1038/srep00480
- Bretteville, A., Planel, E., 2008. Tau aggregates: toxic, inert, or protective species? *J. Alzheimers Dis.* 14, 431–436.
- Brinkmalm, A., Brinkmalm, G., Honer, W.G., Frölich, L., Hausner, L., Minthon, L., Hansson, O., Wallin, A., Zetterberg, H., Blennow, K., Öhrfelt, A., 2014. SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 9, 53. doi:10.1186/1750-1326-9-53
- Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., 1999. beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. *Endocrinology* 140, 4185–4197. doi:10.1210/endo.140.9.6972
- Brouillette, J., 2014. The effects of soluble A $\beta$  oligomers on neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 20, 2506–2519.
- Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., De Strooper, B., Buée, L., 2012. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid- $\beta$ 1-42

- oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J Neurosci* 32, 7852–7861. doi:10.1523/JNEUROSCI.5901-11.2012
- Brown, T.M., Piggins, H.D., 2007. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog. Neurobiol.* 82, 229–255. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.05.002
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
- Burkey, B.F., Dong, M., Gagen, K., Eckhardt, M., Dragonas, N., Chen, W., Grosenstein, P., Argentieri, G., de Souza, C.J., 2000. Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. *Metabolism* 49, 1301–1308. doi:10.1053/meta.2000.9524
- Butchart, J., Holmes, C., 2012. Systemic and central immunity in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Neurosci Ther* 18, 64–76. doi:10.1111/j.1755-5949.2011.00245.x
- Calon, F., Lim, G.P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Ashe, K.H., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2004. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43, 633–645. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.013
- Calon, F., Tremblay, C., François, A., Vandal, M., Bennett, 2015. Neuropathological correlates of cognitive impairments in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1–1.
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2010. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology* 214, 242–253. doi:10.1242/jeb.050989
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
- Caron, A., Labbé, S.M., Carter, S., Roy, M.-C., Lecomte, R., Ricquier, D., Picard, F., Richard, D., 2017. Loss of UCP2 impairs cold-induced non-shivering thermogenesis by promoting a shift toward glucose utilization in brown adipose tissue. *Biochimie* 134, 118–126. doi:10.1016/j.biochi.2017.01.006
- Carpentier, A.C., Blondin, D.P., Virtanen, K.A., Richard, D., Haman, F., Turcotte, E.E., 2018. Brown Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 447. doi:10.3389/fendo.2018.00447
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., Colín-Barenque, L., 2014. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev* 2014, 795375–15. doi:10.1155/2014/795375
- Caruso, D., Barron, A.M., Brown, M.A., Abbiati, F., Carrero, P., Pike, C.J., Garcia-Segura, L.M., Melcangi, R.C., 2013. Age-related changes in neuroactive steroid levels in 3xTg-AD mice. *Neurobiol. Aging* 34, 1080–1089. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.007
- Castellano, C.-A., Nugent, S., Paquet, N., Tremblay, S., Bocti, C., Lacombe, G., Imbeault, H., Turcotte, E., Fulop, T., Cunnane, S.C., 2014. Lower Brain 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake But Normal 11C-Acetoacetate Metabolism in Mild Alzheimer's Disease Dementia. *J. Alzheimers Dis.* 43, 1343–1353. doi:10.3233/JAD-141074
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., Goate, A.M., Bales, K.R., Paul, S.M., Bateman, R.J., Holtzman, D.M., 2011. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance. *Sci Transl Med* 3, 89ra57–89ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3002156
- Caterina, M.J., 2007. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292, R64–76. doi:10.1152/ajpregu.00446.2006
- Cavaleri, F., Bashar, E., 2018. Potential Synergies of  $\beta$ -Hydroxybutyrate and Butyrate on the Modulation of Metabolism, Inflammation, Cognition, and General Health. *J Nutr Metab* 2018, 7195760–13. doi:10.1155/2018/7195760
- Chapon, P.A., Bessot, N., Gauthier, A., Besnard, S., Moussay, S., 2012. Performance testing of an innovative telemetric temperature sensor in animals. *Journal of Thermal Biology* 37, 255–259. doi:10.1016/j.jtherbio.2011.08.004
- Chapple, C.R., (null), L., Nitti, V.W., Siddiqui, E., Michel, M.C., 2014a. Mirabegron in overactive bladder: a review of efficacy, safety, and tolerability. *Neurourol. Urodyn.* 33, 17–30. doi:10.1002/nau.22505

- Chapple, C.R., Kaplan, S.A., Mitcheson, D., Blauwet, M.B., Huang, M., Siddiqui, E., Khullar, V., 2014b. Mirabegron 50 mg once-daily for the treatment of symptoms of overactive bladder: an overview of efficacy and tolerability over 12 weeks and 1 year. *Int. J. Urol.* 21, 960–967. doi:10.1111/iju.12568
- Chapple, C.R., Siddiqui, E., 2017. Mirabegron for the treatment of overactive bladder: a review of efficacy, safety and tolerability with a focus on male, elderly and antimuscarinic poor-responder populations, and patients with OAB in Asia. *Expert Rev Clin Pharmacol* 10, 131–151. doi:10.1080/17512433.2017.1275570
- Chatterjee, S., Peters, S.A.E., Woodward, M., Mejia Arango, S., Batty, G.D., Beckett, N., Beiser, A., Borenstein, A.R., Crane, P.K., Haan, M., Hassing, L.B., Hayden, K.M., Kiyohara, Y., Larson, E.B., Li, C.-Y., Ninomiya, T., Ohara, T., Peters, R., Russ, T.C., Seshadri, S., Strand, B.H., Walker, R., Xu, W., Huxley, R.R., 2016. Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. *Diabetes Care* 39, 300–307. doi:10.2337/dc15-1588
- Chen, H.-F., Chang-Quan, H., You, C., Wang, Z.-R., Hui, W., Liu, Q.-X., Si-Qing, H., 2013. The circadian rhythm of arterial blood pressure in Alzheimer disease (AD) patients without hypertension. *Blood Press.* 22, 101–105. doi:10.3109/08037051.2012.733508
- Chen, J., Hu, J., Liu, H., Xiong, Y., Zou, Y., Huang, W., Shao, M., Wu, J., Yu, L., Wang, X., Wang, X., Lin, L., 2018. FGF21 Protects the Blood-Brain Barrier by Upregulating PPAR $\gamma$  via FGFR1/ $\beta$ -klotho after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 35, 2091–2103. doi:10.1089/neu.2017.5271
- Chen, Run, X., Liang, Z., Zhao, Y., Dai, C.-L., Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., 2014a. Intranasal insulin prevents anesthesia-induced hyperphosphorylation of tau in 3xTg-AD mice. *Front Aging Neurosci* 6, 100. doi:10.3389/fnagi.2014.00100
- Chen, Zhao, Y., Dai, C.-L., Liang, Z., Run, X., Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., 2014b. Intranasal insulin restores insulin signaling, increases synaptic proteins, and reduces A $\beta$  level and microglia activation in the brains of 3xTg-AD mice. *Experimental Neurology* 261, 610–619. doi:10.1016/j.expneurol.2014.06.004
- Cheng, A., Yang, Y., Zhou, Y., Maharana, C., Lu, D., Peng, W., Liu, Y., Wan, R., Marosi, K., Misiak, M., Bohr, V.A., Mattson, M.P., 2016. Mitochondrial SIRT3 Mediates Adaptive Responses of Neurons to Exercise and Metabolic and Excitatory Challenges. *Cell Metabolism* 23, 128–142. doi:10.1016/j.cmet.2015.10.013
- Chêne, G., Beiser, A., Au, R., Preis, S.R., Wolf, P.A., Dufouil, C., Seshadri, S., 2015. Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimers Dement* 11, 310–320. doi:10.1016/j.jalz.2013.10.005
- Chondronikola, M., Volpi, E., Børshiem, E., Porter, C., Annamalai, P., Enerbäck, S., Lidell, M.E., Saraf, M.K., Labbé, S.M., Hurren, N.M., Yfanti, C., Chao, T., Andersen, C.R., Cesani, F., Hawkins, H., Sidossis, L.S., 2014. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 63, 4089–4099. doi:10.2337/db14-0746
- Cifuentes, D., Poittevin, M., Bonnin, P., Ngkelo, A., Kubis, N., Merkulova-Rainon, T., Lévy, B.I., 2017. Inactivation of Nitric Oxide Synthesis Exacerbates the Development of Alzheimer Disease Pathology in APPPS1 Mice (Amyloid Precursor Protein/Presenilin-1). *Hypertension* 70, 613–623. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09742
- Cifuentes, D., Poittevin, M., Dere, E., Broquères-You, D., Bonnin, P., Benessiano, J., Pocard, M., Mariani, J., Kubis, N., Merkulova-Rainon, T., Lévy, B.I., 2015. Hypertension accelerates the progression of Alzheimer-like pathology in a mouse model of the disease. *Hypertension* 65, 218–224. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04139
- Claustre, Y., Leonetti, M., Santucci, V., Bougault, I., Desvignes, C., Rouquier, L., Aubin, N., Keane, P., Busch, S., Chen, Y., Palejwala, V., Tocci, M., Yamdagni, P., Didier, M., Avenet, P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., Scatton, B., Steinberg, R., 2008. Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile. *Neuroscience* 156, 353–364. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.011
- Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A., Trittschuh, E.H., Cholerton, B., Morgan, A., Callaghan, M., Arbuckle, M., Behl, C., Craft, S., 2015. Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild

- cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J. Alzheimers Dis.* 44, 897–906. doi:10.3233/JAD-141791
- Clement, J.G., Mills, P., Brockway, B., 1989. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. *J Pharmacol Methods* 21, 129–140.
- Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M., 2007. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease* 28, 76–82. doi:10.1016/j.nbd.2007.06.013
- Cohen, S.J., Munchow, A.H., Rios, L.M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H.N., Stackman, R.W., 2013. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Curr. Biol.* 23, 1685–1690. doi:10.1016/j.cub.2013.07.002
- Coleman, R.A., Liang, C., Patel, R., Ali, S., Mukherjee, J., 2017. Brain and Brown Adipose Tissue Metabolism in Transgenic Tg2576 Mice Models of Alzheimer Disease Assessed Using (18)F-FDG PET Imaging. *Mol Imaging* 16, 1536012117704557. doi:10.1177/1536012117704557
- Coll, A.P., Yeo, G.S.H., 2013. The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 13, 970–976. doi:10.1016/j.coph.2013.09.010
- Collins, K., 1995. Hypothermia: the elderly person's enemy. *Practitioner* 239, 22–26.
- Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease, 1997. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease., in: Presented at the Neurobiology of aging, pp. S1–2.
- Consoli, D., Leggio, G.M., Mazzola, C., Micale, V., Drago, F., 2007. Behavioral effects of the beta3 adrenoceptor agonist SR58611A: is it the putative prototype of a new class of antidepressant/anxiolytic drugs? *Eur. J. Pharmacol.* 573, 139–147. doi:10.1016/j.ejphar.2007.06.048
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Counts, S.E., Alldred, M.J., Che, S., Ginsberg, S.D., Mufson, E.J., 2014. Synaptic gene dysregulation within hippocampal CA1 pyramidal neurons in mild cognitive impairment. *Neuropharmacology* 79, 172–179. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.018
- Cowan, C.M., Mudher, A., 2013. Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol* 4, 114. doi:10.3389/fneur.2013.00114
- Craft, S., Baker, L.D., Montine, T.J., Minoshima, S., Watson, G.S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S.R., Green, P.S., Leverenz, J., Cross, D., Gerton, B., 2012. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* 69, 29–38. doi:10.1001/archneurol.2011.233
- Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M.W., Schellenberg, G.D., Raskind, M., Porte, D., 1998. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 50, 164–168.
- Crane, P.K., Walker, R., Hubbard, R.A., Li, G., Nathan, D.M., Zheng, H., Haneuse, S., Craft, S., Montine, T.J., Kahn, S.E., McCormick, W., McCurry, S.M., Bowen, J.D., Larson, E.B., 2013. Glucose levels and risk of dementia. *N. Engl. J. Med.* 369, 540–548. doi:10.1056/NEJMoa1215740
- Cui, X., Nguyen, N.L.T., Zarebidaki, E., Cao, Q., Li, F., Zha, L., Bartness, T., Shi, H., Xue, B., 2016. Thermoneutrality decreases thermogenic program and promotes adiposity in high-fat diet-fed mice. *Physiol Rep* 4, e12799. doi:10.14814/phy2.12799
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Zhong, K., 2018. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4, 195–214. doi:10.1016/j.trci.2018.03.009
- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., Paquet, N., Begdouri, H., Bentourkia, M., Turcotte, E., Allard, M., Barberger-Gateau, P., Fulop,

- T., Rapoport, S.I., 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27, 3–20. doi:10.1016/j.nut.2010.07.021
- Cypess, A.M., Chen, Y.-C., Sze, C., Wang, K., English, J., Chan, O., Holman, A.R., Tal, I., Palmer, M.R., Kolodny, G.M., Kahn, C.R., 2012. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10001–10005. doi:10.1073/pnas.1207911109
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G.M., Kahn, C.R., 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780
- Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., Kolodny, G.M., 2015. Activation of human brown adipose tissue by a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metabolism* 21, 33–38. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.009
- Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., Huang, T.L., Roberts-Toler, C., Weiner, L.S., Sze, C., Chacko, A.T., Deschamps, L.N., Herder, L.M., Truchan, N., Glasgow, A.L., Holman, A.R., Gavrilu, A., Hasselgren, P.-O., Mori, M.A., Molla, M., Tseng, Y.-H., 2013. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat. Med.* 19, 635–639. doi:10.1038/nm.3112
- Dal-Pan, A., Dudonné, S., Bourassa, P., Bourdoulous, M., Tremblay, C., Desjardins, Y., Calon, F., Neurophenols consortium, 2016. Cognitive-Enhancing Effects of a Polyphenols-Rich Extract from Fruits without Changes in Neuropathology in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. Preprint*, 1–21. doi:10.3233/JAD-160281
- Daly, N.L., Hoffmann, R., Otvos, L., Craik, D.J., 2000. Role of phosphorylation in the conformation of tau peptides implicated in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 39, 9039–9046.
- Danysz, W., Han, Y., Li, F., Nicoll, J., Buch, P., Hengl, T., Ruitenber, M., Parsons, C., 2018. Browning of white adipose tissue induced by the  $\beta$ 3 agonist CL-316,243 after local and systemic treatment - PK-PD relationship. *Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/j.bbadis.2018.06.007
- Daulatzai, M.A., 2017. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 95, 943–972. doi:10.1002/jnr.23777
- Davis, K.L., Mohs, R.C., Marin, D., Purohit, D.P., Perl, D.P., Lantz, M., Austin, G., Haroutunian, V., 1999. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* 281, 1401–1406.
- De Felice, F.G., Ferreira, S.T., 2014. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. *Diabetes* 63, 2262–2272. doi:10.2337/db13-1954
- de Souza, C.J., Burkey, B.F., 2001. Beta 3-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1433–1449.
- de Souza, C.J., Hirshman, M.F., Horton, E.S., 1997. CL-316,243, a beta3-specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats. *Diabetes* 46, 1257–1263.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., Zlokovic, B.V., 2008. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest.* 118, 4002–4013. doi:10.1172/JCI36663
- Deane, R., Wu, Z., Zlokovic, B.V., 2004. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35, 2628–2631. doi:10.1161/01.STR.0000143452.85382.d1
- DeBow, S., Colbourne, F., 2003. Brain temperature measurement and regulation in awake and freely moving rodents. *Methods* 30, 167–171.
- Deffieux, T., Demene, C., Pernot, M., Tanter, M., 2018. Functional ultrasound neuroimaging: a review of the preclinical and clinical state of the art. *Curr. Opin. Neurobiol.* 50, 128–135. doi:10.1016/j.conb.2018.02.001
- Degroot, D.W., Kenney, W.L., 2007. Impaired defense of core temperature in aged humans during mild cold stress. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292, R103–8. doi:10.1152/ajpregu.00074.2006



- Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J., Patapoutian, A., 2007. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54, 371–378. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.024
- Díaz-Ruiz, C., Wang, J., Ksiezak-Reding, H., Ho, L., Qian, X., Humala, N., Thomas, S., Martínez-Martín, P., Pasinetti, G.M., 2009. Role of Hypertension in Aggravating Abeta Neuropathology of AD Type and Tau-Mediated Motor Impairment. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2009, 107286–9. doi:10.1155/2009/107286
- Djelti, F., Dhenain, M., Terrien, J., Picq, J.-L., Hardy, I., Champeval, D., Perret, M., Schenker, E., Epelbaum, J., Aujard, F., 2016. Impaired fasting blood glucose is associated to cognitive impairment and cerebral atrophy in middle-aged non-human primates. *Aging (Albany NY)* 9, 173–186. doi:10.18632/aging.101148
- Do, K., Laing, B.T., Landry, T., Bunner, W., Mersaud, N., Matsubara, T., Li, P., Yuan, Y., Lu, Q., Huang, H., 2018. The effects of exercise on hypothalamic neurodegeneration of Alzheimer's disease mouse model. *PLoS ONE* 13, e0190205. doi:10.1371/journal.pone.0190205
- Do, T.M., Alata, W., Dodacki, A., Traversy, M.-T., Chacun, H., Pradier, L., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., Calon, F., Bourasset, F., 2014. Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 81, 311–317. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.02.010
- Do, T.M., Dodacki, A., Alata, W., Calon, F., Nicolic, S., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., Bourasset, F., 2016. Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$  Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *J. Alzheimers Dis.* 49, 287–300. doi:10.3233/JAD-150350
- Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., Hovanesian, V., Stopa, E.G., 2006. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 112, 405–415. doi:10.1007/s00401-006-0115-3
- Doufas, A.G., 2003. Consequences of inadvertent perioperative hypothermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 17, 535–549.
- Drucker, D.J., Nauck, M.A., 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368, 1696–1705. doi:10.1016/S0140-6736(06)69705-5
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J.-F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M.-O., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J.-L., O'Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J., Jack, C.R., Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD;" July 23, 2015; Washington DC, USA, 2016. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 12, 292–323. doi:10.1016/j.jalz.2016.02.002
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L.M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K., Davies, P., 2000. Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiology of Disease* 7, 87–98. doi:10.1006/nbdi.1999.0279
- Dulloo, A.G., 2011. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obes Rev* 12, 866–883. doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00909.x
- Edison, P., Archer, H.A., Hinz, R., Hammers, A., Pavese, N., Tai, Y.F., Hotton, G., Cutler, D., Fox, N., Kennedy, A., Rossor, M., Brooks, D.J., 2007. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. *Neurology* 68, 501–508. doi:10.1212/01.wnl.0000244749.20056.d4
- El-Khoury, N.B., Gratuze, M., Petry, F., Papon, M.-A., Julien, C., Marcouiller, F., Morin, F., Nicholls, S.B., Calon, F., Hébert, S.S., Marette, A., Planel, E., 2016. Hypothermia mediates age-dependent increase of tau phosphorylation in db/db mice. *Neurobiology of Disease* 88, 55–65. doi:10.1016/j.nbd.2016.01.005
- Elias, M.F., Davey, A., 2012. Midlife blood pressure, amyloid- $\beta$ , and risk for Alzheimer disease: one more reason to treat hypertension. *Hypertension* 59, 771–772. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.189464

- Emmerzaal, T.L., Kiliaan, A.J., Gustafson, D.R., 2015. 2003-2013: a decade of body mass index, Alzheimer's disease, and dementia. *J. Alzheimers Dis.* 43, 739–755. doi:10.3233/JAD-141086
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briand-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavie-Klutcho, C., Strosberg, A.D., 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245, 1118–1121.
- Enerbäck, S., 2010. Human brown adipose tissue. *Cell Metabolism* 11, 248–252. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.008
- Enzinger, C., Fazekas, F., Matthews, P.M., Ropele, S., Schmidt, H., Smith, S., Schmidt, R., 2005. Risk factors for progression of brain atrophy in aging: six-year follow-up of normal subjects. *Neurology* 64, 1704–1711. doi:10.1212/01.WNL.0000161871.83614.BB
- Erten-Lyons, D., Dodge, H.H., Woltjer, R., Silbert, L.C., Howieson, D.B., Kramer, P., Kaye, J.A., 2013. Neuropathologic basis of age-associated brain atrophy. *JAMA Neurol* 70, 616–622. doi:10.1001/jamaneurol.2013.1957
- Esparza, T.J., Zhao, H., Cirrito, J.R., Cairns, N.J., Bateman, R.J., Holtzman, D.M., Brody, D.L., 2013. Amyloid- $\beta$  oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann. Neurol.* 73, 104–119. doi:10.1002/ana.23748
- Espeland, M.A., Bryan, R.N., Goveas, J.S., Robinson, J.G., Siddiqui, M.S., Liu, S., Hogan, P.E., Casanova, R., Coker, L.H., Yaffe, K., Masaki, K., Rossom, R., Resnick, S.M., WHIMS-MRI Study Group, 2013. Influence of type 2 diabetes on brain volumes and changes in brain volumes: results from the Women's Health Initiative Magnetic Resonance Imaging studies. *Diabetes Care* 36, 90–97. doi:10.2337/dc12-0555
- Esteve Ràfols, M., 2014. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr* 61, 100–112. doi:10.1016/j.endonu.2013.03.011
- Ettcheto, M., Petrov, D., Pedrós, I., Alva, N., Carbonell, T., Beas-Zarate, C., Pallas, M., Auladell, C., Folch, J., Camins, A., 2016. Evaluation of Neuropathological Effects of a High-Fat Diet in a Presymptomatic Alzheimer's Disease Stage in APP/PS1 Mice. *J. Alzheimers Dis.* 54, 233–251. doi:10.3233/JAD-160150
- Evans, B.A., Papaioannou, M., Bonazzi, V.R., Summers, R.J., 1996. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. 117, 210–216.
- Evans, M.C., Barnes, J., Nielsen, C., Kim, L.G., Clegg, S.L., Blair, M., Leung, K.K., Douiri, A., Boyes, R.G., Ourselin, S., Fox, N.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Volume changes in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: cognitive associations. *Eur Radiol* 20, 674–682. doi:10.1007/s00330-009-1581-5
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., Guenette, S., 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4162–4167. doi:10.1073/pnas.0230450100
- Fernandez, A.M., Torres-Alemán, I., 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 225–239. doi:10.1038/nrn3209
- Festuccia, W.T., Blanchard, P.-G., Richard, D., Deshaies, Y., 2010. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR-gamma activation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R159–67. doi:10.1152/ajpregu.00821.2009
- Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., Planel, E., 2012. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav. Brain Res.* 234, 334–342. doi:10.1016/j.bbr.2012.07.004
- Firbank, M.J., Wiseman, R.M., Burton, E.J., Saxby, B.K., O'Brien, J.T., Ford, G.A., 2007. Brain atrophy and white matter hyperintensity change in older adults and relationship to blood pressure. *Brain atrophy, WMH change and blood pressure.* *J. Neurol.* 254, 713–721. doi:10.1007/s00415-006-0238-4
- Fischer, A.W., Hoefig, C.S., Abreu-Vieira, G., de Jong, J.M.A., Petrovic, N., Mittag, J., Cannon, B., Nedergaard, J., 2016. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Rep* 14, 1621–1631. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.041
- Flores, J., Noël, A., Foveau, B., Lynham, J., Lecrux, C., LeBlanc, A.C., 2018. Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 9, 3916. doi:10.1038/s41467-018-06449-x

- Florez-Duquet, M., McDonald, R.B., 1998. Cold-induced thermoregulation and biological aging. *Physiol. Rev.* 78, 339–358.
- Florian, C., Vecsey, C.G., Halassa, M.M., Haydon, P.G., Abel, T., 2011. Astrocyte-derived adenosine and A1 receptor activity contribute to sleep loss-induced deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory in mice. *J Neurosci* 31, 6956–6962. doi:10.1523/JNEUROSCI.5761-10.2011
- Fodale, V., Santamaria, L.B., Schifilliti, D., Mandal, P.K., 2010. Anaesthetics and postoperative cognitive dysfunction: a pathological mechanism mimicking Alzheimer's disease. *Anaesthesia* 65, 388–395. doi:10.1111/j.1365-2044.2010.06244.x
- Foster, B.W., 1869. The Temperature in Diabetes. *J Anat Physiol* 3, 377–378.
- Foster, D.O., Frydman, M.L., 1979. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57, 257–270.
- Fotinos, A.F., Snyder, A.Z., Girton, L.E., Morris, J.C., Buckner, R.L., 2005. Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and AD. *Neurology* 64, 1032–1039. doi:10.1212/01.WNL.0000154530.72969.11
- Fox, R.H., Woodward, P.M., Exton-Smith, A.N., Green, M.F., Donnison, D.V., Wicks, M.H., 1973. Body temperatures in the elderly: a national study of physiological, social, and environmental conditions. *Br Med J* 1, 200–206.
- Freeman, S.H., Kandel, R., Cruz, L., Rozkalne, A., Newell, K., Frosch, M.P., Hedley-Whyte, E.T., Locascio, J.J., Lipsitz, L.A., Hyman, B.T., 2008. Preservation of neuronal number despite age-related cortical brain atrophy in elderly subjects without Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1205–1212. doi:10.1097/NEN.0b013e31818fc72f
- Freiherr, J., Hallschmid, M., Frey, W.H., Brünner, Y.F., Chapman, C.D., Hölscher, C., Craft, S., De Felice, F.G., Benedict, C., 2013. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs* 27, 505–514. doi:10.1007/s40263-013-0076-8
- Frisard, M.I., Broussard, A., Davies, S.S., Roberts, L.J., Rood, J., de Jonge, L., Fang, X., Jazwinski, S.M., Deutsch, W.A., Ravussin, E., Louisiana Healthy Aging Study, 2007. Aging, resting metabolic rate, and oxidative damage: results from the Louisiana Healthy Aging Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 752–759.
- Frisoni, G.B., Boccardi, M., Barkhof, F., Blennow, K., Cappa, S., Chiotis, K., Démonet, J.-F., Garibotto, V., Giannakopoulos, P., Gietl, A., Hansson, O., Herholz, K., Jack, C.R., Nobili, F., Nordberg, A., Snyder, H.M., Ten, M., Varrone, A., Albanese, E., Becker, S., Bossuyt, P., Carrillo, M.C., Cerami, C., Dubois, B., Gallo, V., Giacobini, E., Gold, G., Hurst, S., Lönneborg, A., Lovblad, K.-O., Mattsson, N., Molinuevo, J.-L., Monsch, A.U., Mosimann, U., Padovani, A., Picco, A., Porteri, C., Ratib, O., Saint-Aubert, L., Scerri, C., Scheltens, P., Schott, J.M., Sonni, I., Teipel, S., Vineis, P., Visser, P.J., Yasui, Y., Winblad, B., 2017. Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *Lancet Neurol* 16, 661–676. doi:10.1016/S1474-4422(17)30159-X
- Frisoni, G.B., Bocchetta, M., Chételat, G., Rabinovici, G.D., de Leon, M.J., Kaye, J., Reiman, E.M., Scheltens, P., Barkhof, F., Black, S.E., Brooks, D.J., Carrillo, M.C., Fox, N.C., Herholz, K., Nordberg, A., Jack, C.R., Jagust, W.J., Johnson, K.A., Rowe, C.C., Sperling, R.A., Thies, W., Wahlund, L.-O., Weiner, M.W., Pasqualetti, P., Decarli, C., ISTAART's NeuroImaging Professional Interest Area, 2013. Imaging markers for Alzheimer disease: which vs how. *Neurology* 81, 487–500. doi:10.1212/WNL.0b013e31829d86e8
- Frisoni, G.B., Fox, N.C., Jack, C.R., Scheltens, P., Thompson, P.M., 2010. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77. doi:10.1038/nrneurol.2009.215
- Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J., Feany, M.B., 2014. Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat. Neurosci.* 17, 357–366. doi:10.1038/nn.3639
- Fryer, J.D., Simmons, K., Parsadanian, M., Bales, K.R., Paul, S.M., Sullivan, P.M., Holtzman, D.M., 2005. Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci* 25, 2803–2810. doi:10.1523/JNEUROSCI.5170-04.2005

- García-Mesa, Y., Giménez-Llort, L., López, L.C., Venegas, C., Cristófol, R., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., Sanfeliu, C., 2012. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol. Aging* 33, 1124.e13–29. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.016
- Gauthier, S., Albert, M., Fox, N., Goedert, M., Kivipelto, M., Mestre-Ferrandiz, J., Middleton, L.T., 2016. Why has therapy development for dementia failed in the last two decades? *Alzheimers Dement* 12, 60–64. doi:10.1016/j.jalz.2015.12.003
- Gauthier, S., Molinuevo, J.L., 2013. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 9, 326–331. doi:10.1016/j.jalz.2011.11.005
- Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Reitman, M.L., 2000. Lack of responses to a beta3-adrenergic agonist in lipotrophic A-ZIP/F-1 mice. *Diabetes* 49, 1910–1916.
- Gejl, M., Brock, B., Egefjord, L., Vang, K., Rungby, J., Gjedde, A., 2017. Blood-Brain Glucose Transfer in Alzheimer's disease: Effect of GLP-1 Analog Treatment. *Nature Publishing Group* 7, 17490. doi:10.1038/s41598-017-17718-y
- Gejl, M., Gjedde, A., Egefjord, L., Møller, A., Hansen, S.B., Vang, K., Rodell, A., Brændgaard, H., Gottrup, H., Schacht, A., Møller, N., Brock, B., Rungby, J., 2016. In Alzheimer's Disease, 6-Month Treatment with GLP-1 Analog Prevents Decline of Brain Glucose Metabolism: Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *Front Aging Neurosci* 8, 108. doi:10.3389/fnagi.2016.00108
- Geldmacher, D.S., Provenzano, G., McRae, T., Mastey, V., Ieni, J.R., 2003. Donepezil is associated with delayed nursing home placement in patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 51, 937–944.
- Ghorbani, M., Shafiee Ardestani, M., Gigloo, S.H., Cohan, R.A., Inanlou, D.N., Ghorbani, P., 2012. Anti diabetic effect of CL 316,243 (a  $\beta$ 3-adrenergic agonist) by down regulation of tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) expression. *7*, e45874. doi:10.1371/journal.pone.0045874
- Gibbs, M.E., Maksiel, D., Gibbs, Z., Hou, X., Summers, R.J., Small, D.H., 2010. Memory loss caused by beta-amyloid protein is rescued by a beta(3)-adrenoceptor agonist. *Neurobiol. Aging* 31, 614–624. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.018
- Goedert, M., 2018. Tau filaments in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 592, 2383–2391. doi:10.1002/1873-3468.13108
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.
- Goldstein, B.J., 2002. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 90, 3G–10G.
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2001. Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J.* 15, 2048–2050. doi:10.1096/fj.00-0536fje
- Gomolin, I.H., Aung, M.M., Wolf-Klein, G., Auerbach, C., 2005. Older is colder: temperature range and variation in older people. *J Am Geriatr Soc* 53, 2170–2172. doi:10.1111/j.1532-5415.2005.00500.x
- Gonzales, P., Rikke, B.A., 2010. Thermoregulation in mice exhibits genetic variability early in senescence. *Age (Dordr)* 32, 31–37. doi:10.1007/s11357-009-9109-0
- Gordon, C.J., 2017. The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans. *Physiol. Behav.* 179, 55–66. doi:10.1016/j.physbeh.2017.05.026
- Gordon, C.J., Becker, P., Ali, J.S., 1998. Behavioral thermoregulatory responses of single- and group-housed mice. *Physiol. Behav.* 65, 255–262.
- Götz, J., Bodea, L.-G., Goedert, M., 2018. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 583–598. doi:10.1038/s41583-018-0054-8
- Götz, J., Ittner, L.M., 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 532–544. doi:10.1038/nrn2420
- Graja, A., Schulz, T.J., 2015. Mechanisms of aging-related impairment of brown adipocyte development and function. *Gerontology* 61, 211–217. doi:10.1159/000366557
- Grassi, G., Seravalle, G., Turri, C., Bertinieri, G., Dell'Oro, R., Mancina, G., 2003. Impairment of thermoregulatory control of skin sympathetic nerve traffic in the elderly. *Circulation* 108, 729–735.

- doi:10.1161/01.CIR.0000081769.02847.A1
- Gratuze, M., El-Khoury, N.B., Turgeon, A., Julien, C., Marcouiller, F., Morin, F., Whittington, R.A., Marette, A., Calon, F., Planel, E., 2017a. Tau hyperphosphorylation in the brain of ob/ob mice is due to hypothermia: Importance of thermoregulation in linking diabetes and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 98, 1–8. doi:10.1016/j.nbd.2016.10.004
- Gratuze, M., Joly-Amado, A., Vieau, D., Buée, L., Blum, D., 2018. Mutual Relationship between Tau and Central Insulin Signalling: Consequences for AD and Tauopathies? *Neuroendocrinology* 107, 181–195. doi:10.1159/000487641
- Gratuze, M., Julien, J., Morin, F., Calon, F., Hébert, S.S., Marette, A., Planel, E., 2016. High-fat, high-sugar, and high-cholesterol consumption does not impact tau pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol. Aging* 47, 71–73. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.016
- Gratuze, M., Julien, J., Petry, F.R., Morin, F., Planel, E., 2017b. Insulin deprivation induces PP2A inhibition and tau hyperphosphorylation in hTau mice, a model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Nature Publishing Group* 7, 46359. doi:10.1038/srep46359
- Griffin, R.J., Moloney, A., Kelliher, M., Johnston, J.A., Ravid, R., Dockery, P., O'Connor, R., O'Neill, C., 2005. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of Neurochemistry* 93, 105–117. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02949.x
- Grosbellet, E., Dumont, S., Schuster-Klein, C., Guardiola-Lemaitre, B., Pevet, P., Criscuolo, F., Challet, E., 2016. Circadian phenotyping of obese and diabetic db/db mice. *Biochimie* 124, 198–206. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.029
- Gu, Y., Luchsinger, J.A., Stern, Y., Scarmeas, N., 2010. Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 22, 483–492. doi:10.3233/JAD-2010-100897
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A., Hardy, J., Alzheimer Genetic Analysis Group, 2013. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127. doi:10.1056/NEJMoa1211851
- Gunstad, J., Lhotsky, A., Wendell, C.R., Ferrucci, L., Zonderman, A.B., 2010. Longitudinal examination of obesity and cognitive function: results from the Baltimore longitudinal study of aging. *Neuroepidemiology* 34, 222–229. doi:10.1159/000297742
- Guo, C., Zhang, S., Li, J.-Y., Ding, C., Yang, Z.-H., Chai, R., Wang, X., Wang, Z.-Y., 2016. Chronic hyperglycemia induced via the heterozygous knockout of Pdx1 worsens neuropathological lesion in an Alzheimer mouse model. *Nature Publishing Group* 6, 29396. doi:10.1038/srep29396
- Gustafson, D.R., Clare Morris, M., Scarmeas, N., Shah, R.C., Sijben, J., Yaffe, K., Zhu, X., 2015. New Perspectives on Alzheimer's Disease and Nutrition. *J. Alzheimers Dis.* 46, 1111–1127. doi:10.3233/JAD-150084
- Haase, C., Stieler, J.T., Arendt, T., Holzer, M., 2004. Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *Journal of Neurochemistry* 88, 1509–1520.
- Halliday, M.R., Rege, S.V., Ma, Q., Zhao, Z., Miller, C.A., Winkler, E.A., Zlokovic, B.V., 2016. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 216–227. doi:10.1038/jcbfm.2015.44
- Hamel, E., Royea, J., Ongali, B., Tong, X.-K., 2016. Neurovascular and Cognitive failure in Alzheimer's Disease: Benefits of Cardiovascular Therapy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 219–232. doi:10.1007/s10571-015-0285-4
- Hanon, O., Vidal, J.-S., Lehmann, S., Bombois, S., Allinquant, B., Tréluyer, J.-M., Gelé, P., Delmaire, C., Blanc, F., Mangin, J.-F., Buée, L., Touchon, J., Hugon, J., Vellas, B., Galbrun, E., Benetos, A., Berrut, G., Paillaud, E., Wallon, D., Castelnovo, G., Volpe-Gillot, L., Paccalin, M., Robert, P.-H., Godefroy, O., Dantoine, T., Camus, V., Belmin, J., Vandel, P., Novella, J.-L., Duron, E., Rigaud, A.-S., Schraen-Maschke, S., Gabelle, A., BALTAZAR study group, 2018. Plasma amyloid levels within the Alzheimer's

- process and correlations with central biomarkers. *Alzheimers Dement* 14, 858–868. doi:10.1016/j.jalz.2018.01.004
- Hansen, H.H., Fabricius, K., Barkholt, P., Niehoff, M.L., Morley, J.E., Jelsing, J., Pyke, C., Knudsen, L.B., Farr, S.A., Vrang, N., 2015. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 46, 877–888. doi:10.3233/JAD-143090
- Hanssen, M.J., van der Lans, A.A., Brans, B., Hoeks, J., Jardon, K.M., Schaart, G., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., van Marken Lichtenbelt, W.D., 2015a. Short-term cold acclimation recruits brown adipose tissue in obese humans. *Diabetes* db151372. doi:10.2337/db15-1372
- Hanssen, M.J.W., Hoeks, J., Brans, B., van der Lans, A.A.J.J., Schaart, G., van den Driessche, J.J., Jörgensen, J.A., Boekschoten, M.V., Hesselink, M.K.C., Havekes, B., Kersten, S., Mottaghy, F.M., van Marken Lichtenbelt, W.D., Schrauwen, P., 2015b. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Med.* 21, 863–865. doi:10.1038/nm.3891
- Hanyu, H., Sato, T., Kiuchi, A., Sakurai, H., Iwamoto, T., 2009. Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc* 57, 177–179. doi:10.1111/j.1532-5415.2009.02067.x
- Harms, M., Seale, P., 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19, 1252–1263. doi:10.1038/nm.3361
- Harper, D.G., Stopa, E.G., McKee, A.C., Satlin, A., Fish, D., Volicer, L., 2004. Dementia severity and Lewy bodies affect circadian rhythms in Alzheimer disease. *NBA* 25, 771–781. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2003.04.009
- Harper, D.G., Stopa, E.G., McKee, A.C., Satlin, A., Harlan, P.C., Goldstein, R., Volicer, L., 2001. Differential circadian rhythm disturbances in men with Alzheimer disease and frontotemporal degeneration. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 353–360.
- Harris, W.H., Foster, D.O., Nadeau, B.E., 1985. Evidence for a contribution by brown adipose tissue to the development of fever in the young rabbit. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63, 595–598.
- Harvey, J., 2010. Leptin: the missing link in Alzheimer disease? *Clin. Chem.* 56, 696–697. doi:10.1373/clinchem.2010.144006
- Hebda-Bauer, E.K., Simmons, T.A., Sugg, A., Ural, E., Stewart, J.A., Beals, J.L., Wei, Q., Watson, S.J., Akil, H., 2013. 3xTg-AD mice exhibit an activated central stress axis during early-stage pathology. *J. Alzheimers Dis.* 33, 407–422. doi:10.3233/JAD-2012-121438
- Hebert, L.E., Bienias, J.L., Aggarwal, N.T., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Shah, R.C., Evans, D.A., 2010. Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* 75, 786–791. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f0754f
- Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., Evans, D.A., 2013. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778–1783. doi:10.1212/WNL.0b013e31828726f5
- Hellweg, R., Wirth, Y., Janetzky, W., Hartmann, S., 2012. Efficacy of memantine in delaying clinical worsening in Alzheimer's disease (AD): responder analyses of nine clinical trials with patients with moderate to severe AD. *Int J Geriatr Psychiatry* 27, 651–656. doi:10.1002/gps.2766
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, E.J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P., 2015a. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14, 388–405. doi:10.1016/S1474-4422(15)70016-5
- Heneka, M.T., Fink, A., Doblhammer, G., 2015b. Effect of pioglitazone medication on the incidence of dementia. *Ann. Neurol.* 78, 284–294. doi:10.1002/ana.24439
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372. doi:10.1038/nrn3880
- Hoffmann, C., Leitz, M.R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M.J., Klotz, K.-N., 2004. Comparative pharmacology of

- human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 151–159. doi:10.1007/s00210-003-0860-y
- Hofstra, W.A., de Weerd, A.W., 2008. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. *Epilepsy Behav* 13, 438–444. doi:10.1016/j.yebeh.2008.06.002
- Hohman, T.J., Bell, S.P., Jefferson, A.L., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2015. The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 72, 520–529. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4761
- Holtzman, D.M., Herz, J., Bu, G., 2012. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006312–a006312. doi:10.1101/cshperspect.a006312
- Hondares, E., Iglesias, R., Giral, A., Gonzalez, F.J., Giral, M., Mampel, T., Villarroya, F., 2011. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990. doi:10.1074/jbc.M110.215889
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Stevens, B., 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716. doi:10.1126/science.aad8373
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 104, 1433–1439. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x
- Hori, A., Minato, K., Kobayashi, S., 1999. Warming-activated channels of warm-sensitive neurons in rat hypothalamic slices. *Neurosci. Lett.* 275, 93–96.
- Hoshino, A., Tamura, J., Nakazawa, M., Koyama, H., 2007. Middle-aged and elderly outpatients show lower body temperature responses than the young, even with the same C-reactive protein levels. *J. Int. Med. Res.* 35, 329–337.
- Howell, T.H., 1975. Oral temperature range in old age. *Gerontol Clin (Basel)* 17, 133–136.
- Hsueh, H., Pan, W., Kastin, A.J., 2007. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* 28, 2382–2386. doi:10.1016/j.peptides.2007.10.007
- Huitrón-Reséndiz, S., Sánchez-Alavez, M., Gallegos, R., Berg, G., Crawford, E., Giacchino, J.L., Games, D., Henriksen, S.J., Criado, J.R., 2002. Age-independent and age-related deficits in visuospatial learning, sleep-wake states, thermoregulation and motor activity in PDAPP mice. *Brain Res.* 928, 126–137.
- Huttunen, P., Hirvonen, J., Kinnula, V., 1981. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 46, 339–345.
- Iadecola, C., 2017. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96, 17–42. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.030
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., 2016. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* 12, 15–27. doi:10.1038/nrneurol.2015.225
- Ishii, K., Kuwahara, M., Tsubone, H., Sugano, S., 1996. The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Lab. Anim.* 30, 7–12. doi:10.1258/002367796780744992
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y., 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53.
- Jack, C.R., Bennett, Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.-L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., Sperling, R., Contributors, 2018. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14, 535–562. doi:10.1016/j.jalz.2018.02.018
- Jacobsen, J.S., Wu, C.-C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., Bloom, F.E., 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5161–5166. doi:10.1073/pnas.0600948103

- Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., Younkin, S.G., Borchelt, D.R., 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet.* 13, 159–170. doi:10.1093/hmg/ddh019
- Janus, C., Flores, A.Y., Xu, G., Borchelt, D.R., 2015. Behavioral abnormalities in APPSwe/PS1dE9 mouse model of AD-like pathology: comparative analysis across multiple behavioral domains. *Neurobiol. Aging* 36, 2519–2532. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.010
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., 1993. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 144–148.
- Jauch-Chara, K., Binkofski, F., Loebig, M., Reetz, K., Jahn, G., Melchert, U.H., Schweiger, U., Oltmanns, K.M., 2015. Blunted brain energy consumption relates to insula atrophy and impaired glucose tolerance in obesity. *Diabetes* 64, 2082–2091. doi:10.2337/db14-0421
- Jhaveri, K.A., Trammell, R.A., Toth, L.A., 2007. Effect of environmental temperature on sleep, locomotor activity, core body temperature and immune responses of C57BL/6J mice. *Brain Behav. Immun.* 21, 975–987. doi:10.1016/j.bbi.2007.03.007
- Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., Richardson, J.C., Smith, J.D., Comery, T.A., Riddell, D., Holtzman, D.M., Tontonoz, P., Landreth, G.E., 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58, 681–693. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.010
- Jolival, C.G., Lee, C.A., Beiswenger, K.K., Smith, J.L., Orlov, M., Torrance, M.A., Masliah, E., 2008. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J. Neurosci. Res.* 86, 3265–3274. doi:10.1002/jnr.21787
- Julien, C., Tremblay, C., Bendjelloul, F., Phivilay, A., Coulombe, M.-A., Emond, V., Calon, F., 2008. Decreased drebrin mRNA expression in Alzheimer disease: correlation with tau pathology. *J. Neurosci. Res.* 86, 2292–2302. doi:10.1002/jnr.21667
- Julien, C., Tremblay, C., Emond, V., Lebbadi, M., Salem, N., Bennett, Calon, F., 2009. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 48–58. doi:10.1097/NEN.0b013e3181922348
- Julien, C., Tremblay, C., Phivilay, A., Berthiaume, L., Emond, V., Julien, P., Calon, F., 2010. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol. Aging* 31, 1516–1531. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.022
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210. doi:10.1038/35093019
- Kalaria, R.N., 2012. Cerebrovascular disease and mechanisms of cognitive impairment: evidence from clinicopathological studies in humans. *Stroke* 43, 2526–2534. doi:10.1161/STROKEAHA.112.655803
- Kalaria, R.N., Harik, S.I., 1989. Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry* 53, 1083–1088.
- Kalaria, R.N., Kalimo, H., 2002. Introduction: Non-atherosclerotic cerebrovascular disorders. *Brain Pathol.* 12, 337–342.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.
- Kanemitsu, H., Tomiyama, T., Mori, H., 2003. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci. Lett.* 350, 113–116.
- Kapasi, A., Decarli, C., Schneider, J.A., 2017. Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathol* 134, 171–186. doi:10.1007/s00401-017-1717-7
- Karp, C.L., 2012. Unstressing intertemperate models: how cold stress undermines mouse modeling. *J. Exp. Med.* 209, 1069–1074. doi:10.1084/jem.20120988
- Karran, E., De Strooper, B., 2016. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry* 139 Suppl 2, 237–252. doi:10.1111/jnc.13632
- Kashiwaya, Y., Bergman, C., Lee, J.-H., Wan, R., King, M.T., Mughal, M.R., Okun, E., Clarke, K., Mattson,



- M.P., Veech, R.L., 2013. A ketone ester diet exhibits anxiolytic and cognition-sparing properties, and lessens amyloid and tau pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 34, 1530–1539. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.023
- Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J., Glabe, C., 2009. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J. Biol. Chem.* 284, 4230–4237. doi:10.1074/jbc.M808591200
- Kenny, G.P., Journeay, W.S., 2010. Human thermoregulation: separating thermal and nonthermal effects on heat loss. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15, 259–290.
- Kharitononkov, A., Adams, A.C., 2014. Inventing new medicines: The FGF21 story. *Molecular Metabolism* 3, 221–229. doi:10.1016/j.molmet.2013.12.003
- Khatoun, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1994. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.* 351, 80–84.
- Kim, Backus, C., Oh, S., Feldman, E.L., 2013. Hyperglycemia-induced tau cleavage in vitro and in vivo: a possible link between diabetes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 34, 727–739. doi:10.3233/JAD-121669
- Kim, Backus, C., Oh, S., Hayes, J.M., Feldman, E.L., 2009. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 150, 5294–5301. doi:10.1210/en.2009-0695
- Kim, H., Pennisi, P.A., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Setser-Portas, J., East-Palmer, J., Tang, Y., Manganiello, V.C., Leroith, D., 2006. Effect of adipocyte beta3-adrenergic receptor activation on the type 2 diabetic MKR mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E1227–36. doi:10.1152/ajpendo.00344.2005
- Kim, J.-H., Bae, K.-H., Choi, Y.-K., Go, Y., Choe, M., Jeon, Y.-H., Lee, H.-W., Koo, S.-H., Perfield, J.W., Harris, R.A., Lee, I.-K., Park, K.-G., 2015. Fibroblast growth factor 21 analogue LY2405319 lowers blood glucose in streptozotocin-induced insulin-deficient diabetic mice by restoring brown adipose tissue function. *Diabetes Obes Metab* 17, 161–169. doi:10.1111/dom.12408
- Kitamura, T., Sugimori, K., Sudo, S., Kobayashi, K., 2005. Relationship between microtubule-binding repeats and morphology of neurofibrillary tangle in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 112, 327–334. doi:10.1111/j.1600-0404.2005.00488.x
- Klaffke, S., Staedt, J., 2006. Sundowning and circadian rhythm disorders in dementia. *Acta Neurol Belg* 106, 168–175.
- Klegeris, A., Schulzer, M., Harper, D.G., McGeer, P.L., 2007. Increase in core body temperature of Alzheimer's disease patients as a possible indicator of chronic neuroinflammation: a meta-analysis. *Gerontology* 53, 7–11. doi:10.1159/000095386
- Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E., 2001. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 24, 219–224.
- Kleinberger, G., Brendel, M., Mracsko, E., Wefers, B., Groeneweg, L., Xiang, X., Focke, C., Deußing, M., Suárez-Calvet, M., Mazaheri, F., Parhizkar, S., Pettkus, N., Wurst, W., Feederle, R., Bartenstein, P., Mueggler, T., Arzberger, T., Knuesel, I., Rominger, A., Haass, C., 2017. The FTD-like syndrome causing TREM2 T66M mutation impairs microglia function, brain perfusion, and glucose metabolism. *EMBO J.* 36, 1837–1853. doi:10.15252/embj.201796516
- Kleinridders, A., Ferris, H.A., Cai, W., Kahn, C.R., 2014. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes* 63, 2232–2243. doi:10.2337/db14-0568
- Knight, E.M., Brown, T.M., Gümüşgöz, S., Smith, J.C.M., Waters, E.J., Allan, S.M., Lawrence, C.B., 2013. Age-related changes in core body temperature and activity in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice. *Dis Model Mech* 6, 160–170. doi:10.1242/dmm.010173
- Knopman, D.S., Gottesman, R.F., Sharrett, A.R., Tapia, A.L., DavisThomas, S., Windham, B.G., Coker, L., Schneider, A.L.C., Alonso, A., Coresh, J., Albert, M.S., Mosley, T.H., 2018a. Midlife vascular risk factors and midlife cognitive status in relation to prevalence of mild cognitive impairment and dementia in later life: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Alzheimers Dement* 14, 1406–1415. doi:10.1016/j.jalz.2018.03.011
- Knopman, D.S., Haeblerlein, S.B., Carrillo, M.C., Hendrix, J.A., Kerchner, G., Margolin, R., Maruff, P., Miller,

- D.S., Tong, G., Tome, M.B., Murray, M.E., Nelson, P.T., Sano, M., Mattsson, N., Sultzer, D.L., Montine, T.J., Jack, C.R., Kolb, H., Petersen, R.C., Vemuri, P., Canniere, M.Z., Schneider, J.A., Resnick, S.M., Romano, G., van Harten, A.C., Wolk, D.A., Bain, L.J., Siemers, E., 2018b. The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimers Dement* 14, 563–575. doi:10.1016/j.jalz.2018.03.002
- Knouff, C., Hinsdale, M.E., Mezdoor, H., Altenburg, M.K., Watanabe, M., Quarfordt, S.H., Sullivan, P.M., Maeda, N., 1999. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J. Clin. Invest.* 103, 1579–1586. doi:10.1172/JCI6172
- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., Novak, M., 2014. First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimers Res Ther* 6, 44. doi:10.1186/alzrt278
- Kordower, J.H., Chu, Y., Stebbins, G.T., DeKosky, S.T., Cochran, E.J., Bennett, D., Mufson, E.J., 2001. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 49, 202–213.
- Krau, S.D., 2013. Heat-related illness: a hot topic in critical care. *Crit Care Nurs Clin North Am* 25, 251–262. doi:10.1016/j.ccell.2013.02.012
- Kremer, A., Louis, J.V., Jaworski, T., Van Leuven, F., 2011. GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.... *Front Mol Neurosci* 4, 17. doi:10.3389/fnmol.2011.00017
- Krikorian, R., Boespflug, E.L., Fleck, D.E., Stein, A.L., Wightman, J.D., Shidler, M.D., Sadat-Hossieny, S., 2012. Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5736–5742. doi:10.1021/jf300277g
- Kumar, A., Shiloach, J., Betenbaugh, M.J., Gallagher, E.J., 2015. The beta-3 adrenergic agonist (CL-316,243) restores the expression of down-regulated fatty acid oxidation genes in type 2 diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)* 12, 8. doi:10.1186/s12986-015-0003-8
- Kumar, N.N., Lochhead, J.J., Pizzo, M.E., Nehra, G., Boroumand, S., Greene, G., Thorne, R.G., 2018. Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal administration: Distribution, dose-response, and mechanisms of delivery. *J Control Release* 286, 467–484. doi:10.1016/j.jconrel.2018.08.006
- Kumar-Singh, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R., Van Broeckhoven, C., 2006. Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum. Mutat.* 27, 686–695. doi:10.1002/humu.20336
- Kummer, M.P., Schwarzenberger, R., Sayah-Jeanne, S., Dubernet, M., Walczak, R., Hum, D.W., Schwartz, S., Axt, D., Heneka, M.T., 2015. Pan-PPAR modulation effectively protects APP/PS1 mice from amyloid deposition and cognitive deficits. *Mol. Neurobiol.* 51, 661–671. doi:10.1007/s12035-014-8743-4
- Kuroda, M., Muramatsu, R., Maedera, N., Koyama, Y., Hamaguchi, M., Fujimura, H., Yoshida, M., Konishi, M., Itoh, N., Mochizuki, H., Yamashita, T., 2017. Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 127, 3496–3509. doi:10.1172/JCI94337
- Kvartsberg, H., Duits, F.H., Ingelsson, M., Andreassen, N., Öhrfelt, A., Andersson, K., Brinkmalm, G., Lannfelt, L., Minthon, L., Hansson, O., Andreasson, U., Teunissen, C.E., Scheltens, P., van der Flier, W.M., Zetterberg, H., Portelius, E., Blennow, K., 2015. Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 11, 1180–1190. doi:10.1016/j.jalz.2014.10.009
- Kwok, C.S., Loke, Y.K., Hale, R., Potter, J.F., Myint, P.K., 2011. Atrial fibrillation and incidence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 76, 914–922. doi:10.1212/WNL.0b013e31820f2e38
- Labbé, S.M., Caron, A., Bakan, I., Laplante, M., Carpentier, A.C., Lecomte, R., Richard, D., 2015a. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB J.* 29, 2046–2058. doi:10.1096/fj.14-266247
- Labbé, S.M., Caron, A., Chechi, K., Laplante, M., Lecomte, R., Richard, D., 2016. Metabolic activity of brown, “beige,” and white adipose tissues in response to chronic adrenergic stimulation in male mice. *Am. J.*

- Physiol. Endocrinol. Metab. 311, E260–8. doi:10.1152/ajpendo.00545.2015
- Labbé, S.M., Caron, A., Festuccia, W.T., Lecomte, R., Richard, D., 2018. Interscapular brown adipose tissue denervation does not promote the oxidative activity of inguinal white adipose tissue in male mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* doi:10.1152/ajpendo.00210.2018
- Labbé, S.M., Caron, A., Lanfray, D., Monge-Rofarello, B., Bartness, T.J., Richard, D., 2015b. Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Syst Neurosci* 9, 150. doi:10.3389/fnsys.2015.00150
- LaFerla, F.M., Green, K.N., 2012. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006320–a006320. doi:10.1101/cshperspect.a006320
- Landau, S.M., Harvey, D., Madison, C.M., Reiman, E.M., Foster, N.L., Aisen, P.S., Petersen, R.C., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Jack, C.R., Weiner, M.W., Jagust, W.J., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Comparing predictors of conversion and decline in mild cognitive impairment. *Neurology* 75, 230–238. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e8e8b8
- Landsberg, L., 2012. Core temperature: a forgotten variable in energy expenditure and obesity? *Obes Rev* 13 Suppl 2, 97–104. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01040.x
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K., Rockwood, K., 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch. Neurol.* 58, 498–504.
- Le Freche, H., Brouillette, J., Fernandez-Gomez, F.-J., Patin, P., Caillierez, R., Zommer, N., Sergeant, N., Buée-Scherrer, V., Lebuffe, G., Blum, D., Buée, L., 2012. Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia: an association to postoperative cognitive impairment. *Anesthesiology* 116, 779–787. doi:10.1097/ALN.0b013e31824be8c7
- Lebbadi, M., Julien, C., Phivilay, A., Tremblay, C., Emond, V., Kang, J.X., Calon, F., 2011. Endogenous conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids improves neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 27, 853–869. doi:10.3233/JAD-2011-111010
- Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F.-J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Demeyer, D., Caillierez, R., Zommer, N., Vallez, E., Bantubungi, K., Breton, C., Pigny, P., Buée-Scherrer, V., Staels, B., Hamdane, M., Tailleux, A., Buée, L., Blum, D., 2013. Detrimental effects of diet-induced obesity on  $\tau$  pathology are independent of insulin resistance in  $\tau$  transgenic mice. *Diabetes* 62, 1681–1688. doi:10.2337/db12-0866
- Lee, C.Y.D., Landreth, G.E., 2010. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna)* 117, 949–960. doi:10.1007/s00702-010-0433-4
- Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., Caterina, M.J., 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 25, 1304–1310. doi:10.1523/JNEUROSCI.4745.04.2005
- Lee, P., Greenfield, J.R., 2015. Non-pharmacological and pharmacological strategies of brown adipose tissue recruitment in humans. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418 Pt 2, 184–190. doi:10.1016/j.mce.2015.05.025
- Lee, P., Smith, S., Linderman, J., Courville, A.B., Brychta, R.J., Dieckmann, W., Werner, C.D., Chen, K.Y., Celi, F.S., 2014. Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 63, 3686–3698. doi:10.2337/db14-0513
- Leen, W.G., Klepper, J., Verbeek, M.M., Leferink, M., Hofste, T., van Engelen, B.G., Wevers, R.A., Arthur, T., Bahi-Buisson, N., Ballhausen, D., Bekhof, J., van Bogaert, P., Carrilho, I., Chabrol, B., Champion, M.P., Coldwell, J., Clayton, P., Donner, E., Evangelidou, A., Ebinger, F., Farrell, K., Forsyth, R.J., de Goede, C.G.E.L., Gross, S., Grunewald, S., Holthausen, H., Jayawant, S., Lachlan, K., Laugel, V., Leppig, K., Lim, M.J., Mancini, G., Marina, A.D., Martorell, L., McMenamin, J., Meuwissen, M.E.C., Mundy, H., Nilsson, N.O., Panzer, A., Poll-The, B.T., Rauscher, C., Rouselle, C.M.R., Sandvig, I., Scheffner, T., Sheridan, E., Simpson, N., Sykora, P., Tomlinson, R., Trounce, J., Webb, D., Weschke, B., Scheffer, H., Willemsen, M.A., 2010. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain* 133, 655–670. doi:10.1093/brain/awp336
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., Freret, T., 2013. Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 8, 2531–2537. doi:10.1038/nprot.2013.155
- Leitner, B.P., Huang, S., Brychta, R.J., Duckworth, C.J., Baskin, A.S., McGehee, S., Tal, I., Dieckmann, W.,

- Gupta, G., Kolodny, G.M., Pacak, K., Herscovitch, P., Cypess, A.M., Chen, K.Y., 2017. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 8649–8654. doi:10.1073/pnas.1705287114
- Lenard, N.R., Gettys, T.W., Dunn, A.J., 2003. Activation of beta2- and beta3-adrenergic receptors increases brain tryptophan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 653–659. doi:10.1124/jpet.102.048249
- Leng, Y., Wang, Z., Tsai, L.-K., Leeds, P., Fessler, E.B., Wang, J., Chuang, D.-M., 2015. FGF-21, a novel metabolic regulator, has a robust neuroprotective role and is markedly elevated in neurons by mood stabilizers. *Mol. Psychiatry* 20, 215–223. doi:10.1038/mp.2013.192
- Lenhardt, R., 2010. The effect of anesthesia on body temperature control. *Front Biosci (Schol Ed)* 2, 1145–1154.
- Leung, K.K., Bartlett, J.W., Barnes, J., Manning, E.N., Ourselin, S., Fox, N.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2013. Cerebral atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: rates and acceleration. *Neurology* 80, 648–654. doi:10.1212/WNL.0b013e318281ccd3
- Lim, A.S.P., Gaiteri, C., Yu, L., Sohail, S., Swardfager, W., Tasaki, S., Schneider, J.A., Paquet, C., Stuss, D.T., Masellis, M., Black, S.E., Hugon, J., Buchman, A.S., Barnes, L.L., Bennett, De Jager, P.L., 2018. Seasonal plasticity of cognition and related biological measures in adults with and without Alzheimer disease: Analysis of multiple cohorts. *PLoS Med.* 15, e1002647. doi:10.1371/journal.pmed.1002647
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2001. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21, 8370–8377.
- Lim, S., Honek, J., Xue, Y., Seki, T., Cao, Z., Andersson, P., Yang, X., Hosaka, K., Cao, Y., 2012. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 7, 606–615. doi:10.1038/nprot.2012.013
- Liraz, O., Boehm-Cagan, A., Michaelson, D.M., 2013. ApoE4 induces A $\beta$ 42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice. *Molecular Neurodegeneration* 8, 16. doi:10.1186/1750-1326-8-16
- Liu, J., Wang, L.-N., Jia, J.-P., 2015. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists for Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Drugs Aging* 32, 57–65. doi:10.1007/s40266-014-0228-7
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., 2011. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J. Pathol.* 225, 54–62. doi:10.1002/path.2912
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., 2009. Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 111, 242–249. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06320.x
- Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C.-X., 2008. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 582, 359–364. doi:10.1016/j.febslet.2007.12.035
- Lleó, A., Greenberg, S.M., Growdon, J.H., 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 57, 513–533. doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131442
- Lochhead, J.J., Thorne, R.G., 2012. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 614–628. doi:10.1016/j.addr.2011.11.002
- Loh, R.K.C., Formosa, M.F., La Gerche, A., Reutens, A.T., Kingwell, B.A., Carey, A.L., 2018. The acute metabolic and cardiovascular effects of mirabegron in healthy individuals. *Diabetes Obes Metab.* doi:10.1111/dom.13516
- Lourenço, C.F., Ledo, A., Barbosa, R.M., Laranjinha, J., 2017. Neurovascular uncoupling in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: Impaired cerebral blood flow response to neuronal-derived nitric oxide signaling. *Experimental Neurology* 291, 36–43. doi:10.1016/j.expneurol.2017.01.013
- Luchsinger, J.A., 2008. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 119–129. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.048
- Luchsinger, J.A., Gustafson, D.R., 2009. Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 16, 693–704. doi:10.3233/JAD-2009-1022
- Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Shea, S., Mayeux, R., 2002. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease.

- Arch. Neurol. 59, 1258–1263.
- Lushington, K., Dawson, D., Lack, L., 2000. Core body temperature is elevated during constant wakefulness in elderly poor sleepers. *Sleep* 23, 504–510.
- Lyketsos, C.G., Carrillo, M.C., Ryan, J.M., Khachaturian, A.S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., Miller, D.S., 2011. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease., in: Presented at the Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, pp. 532–539. doi:10.1016/j.jalz.2011.05.2410
- Ma, D.-L., Chen, F.-Q., Xu, W.-J., Yue, W.-Z., Yuan, G., Yang, Y., 2015. Early intervention with glucagon-like peptide 1 analog liraglutide prevents tau hyperphosphorylation in diabetic db/db mice. *Journal of Neurochemistry* 135, 301–308. doi:10.1111/jnc.13248
- Mack, G., Nishiyasu, T., Shi, X., 1995. Baroreceptor modulation of cutaneous vasodilator and sudomotor responses to thermal stress in humans. *J Physiol* 483 ( Pt 2), 537–547.
- MacPherson, R.E.K., Castellani, L., Beaudoin, M.-S., Wright, D.C., 2014. Evidence for fatty acids mediating CL 316,243-induced reductions in blood glucose in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307, E563–70. doi:10.1152/ajpendo.00287.2014
- Madden, C.J., Morrison, S.F., 2018. Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci. Lett.* doi:10.1016/j.neulet.2018.11.027
- Maezawa, I., Zimin, P.I., Wulff, H., Jin, L.-W., 2011. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 286, 3693–3706. doi:10.1074/jbc.M110.135244
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y., 2009. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S183–8. doi:10.1194/jlr.R800069-JLR200
- Maillard, P., Carmichael, O., Fletcher, E., Reed, B., Mungas, D., Decarli, C., 2012. Coevolution of white matter hyperintensities and cognition in the elderly. *Neurology* 79, 442–448. doi:10.1212/WNL.0b013e3182617136
- Mamelak, M., 2012. Sporadic Alzheimer's disease: the starving brain. *J. Alzheimers Dis.* 31, 459–474. doi:10.3233/JAD-2012-120370
- Mandrekar-Colucci, S., Karlo, J.C., Landreth, G.E., 2012. Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32, 10117–10128. doi:10.1523/JNEUROSCI.5268-11.2012
- Manschot, S.M., Brands, A.M.A., van der Grond, J., Kessels, R.P.C., Algra, A., Kappelle, L.J., Biessels, G.J., Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group, 2006. Brain magnetic resonance imaging correlates of impaired cognition in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 1106–1113.
- Mao, Y.-F., Guo, Z., Zheng, T., Jiang, Y., Yan, Y., Yin, X., Chen, Zhang, B., 2016. Intranasal insulin alleviates cognitive deficits and amyloid pathology in young adult APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Aging Cell.* doi:10.1111/acer.12498
- Marion, G.S., McGann, K.P., Camp, D.L., 1991. Core body temperature in the elderly and factors which influence its measurement. *Gerontology* 37, 225–232. doi:10.1159/000213265
- Markan, K.R., Naber, M.C., Small, S.M., Peltekian, L., Kessler, R.L., Potthoff, M.J., 2017. FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue. *Molecular Metabolism* 6, 602–610. doi:10.1016/j.molmet.2017.03.009
- Marshall, R.S., 2012. Effects of altered cerebral hemodynamics on cognitive function. *J. Alzheimers Dis.* 32, 633–642. doi:10.3233/JAD-2012-120949
- Martin, L., Latypova, X., Terro, F., 2011. Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 58, 458–471. doi:10.1016/j.neuint.2010.12.023
- Mateo, I., Llorca, J., Infante, J., Rodríguez-Rodríguez, E., Fernández-Viadero, C., Peña, N., Berciano, J., Combarros, O., 2007. Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 116, 56–58. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00775.x
- Mattson, M.P., 2010. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Research Reviews* 9, 69–76. doi:10.1016/j.arr.2009.11.004

- McClellan, P.L., Parthasarathy, V., Faivre, E., Hölscher, C., 2011. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 31, 6587–6594. doi:10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011
- McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58. doi:10.1038/nature719
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C.H., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease., in: Presented at the Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, pp. 263–269. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
- Mekjavic, I.B., Eiken, O., 2006. Contribution of thermal and nonthermal factors to the regulation of body temperature in humans. *J. Appl. Physiol.* 100, 2065–2072. doi:10.1152/jappphysiol.01118.2005
- Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G., 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480–489. doi:10.1038/nature10673
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597. doi:10.1016/j.tins.2013.07.001
- Meyer, C.W., Ootsuka, Y., Romanovsky, A.A., 2017. Body Temperature Measurements for Metabolic Phenotyping in Mice. *Front. Physiol.* 8, 520. doi:10.3389/fphys.2017.00520
- Michaelson, D.M., 2014. APOE ε4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10, 861–868. doi:10.1016/j.jalz.2014.06.015
- Mielke, M.M., Vemuri, P., Rocca, W.A., 2014. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol* 6, 37–48. doi:10.2147/CLEP.S37929
- Mikolaenko, I., Pletnikova, O., Kawas, C.H., O'Brien, R., Resnick, S.M., Crain, B., Troncoso, J.C., 2005. Alpha-synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 156–162.
- Miller, M.C., Tavares, R., Johanson, C.E., Hovanesian, V., Donahue, J.E., Gonzalez, L., Silverberg, G.D., Stopa, E.G., 2008. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1230, 273–280. doi:10.1016/j.brainres.2008.06.124
- Mineo, P.M., Cassell, E.A., Roberts, M.E., Schaeffer, P.J., 2012. Chronic cold acclimation increases thermogenic capacity, non-shivering thermogenesis and muscle citrate synthase activity in both wild-type and brown adipose tissue deficient mice. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 161, 395–400. doi:10.1016/j.cbpa.2011.12.012
- Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., Berg, L., 1991. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479–486.
- Mogi, M., Horiuchi, M., 2009. Effects of angiotensin II receptor blockers on dementia. *Hypertens. Res.* 32, 738–740. doi:10.1038/hr.2009.110
- Moloney, A.M., Griffin, R.J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., O'Neill, C., 2010. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol. Aging* 31, 224–243. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002
- Montine, T.J., Monsell, S.E., Beach, T.G., Bigio, E.H., Bu, Y., Cairns, N.J., Frosch, M., Henriksen, J., Kofler, J., Kukull, W.A., Lee, E.B., Nelson, P.T., Schantz, A.M., Schneider, J.A., Sonnen, J.A., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., Zhou, X.-H., Hyman, B.T., 2016. Multisite assessment of NIA-AA guidelines for the neuropathologic evaluation of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 12, 164–169. doi:10.1016/j.jalz.2015.07.492
- Montine, T.J., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., Hyman, B.T., National Institute on Aging, Alzheimer's Association, 2012. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a

- practical approach. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-011-0910-3
- Moore, A., Patterson, C., Lee, L., Vedel, I., Bergman, H., Canadian Consensus Conference on the Diagnosis and Treatment of Dementia, 2014. Fourth Canadian Consensus Conference on the Diagnosis and Treatment of Dementia: recommendations for family physicians., in: Presented at the Canadian family physician *Medecin de famille canadien*, College of Family Physicians of Canada, pp. 433–438.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., Patapoutian, A., 2005. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468–1472. doi:10.1126/science.1108609
- Morris, J.C., Blennow, K., Froelich, L., Nordberg, A., Soininen, H., Waldemar, G., Wahlund, L.-O., Dubois, B., 2014. Harmonized diagnostic criteria for Alzheimer's disease: recommendations., in: Presented at the *Journal of internal medicine*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 204–213. doi:10.1111/joim.12199
- Morris, M., Knudsen, G.M., Maeda, S., Trinidad, J.C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A.L., Mucke, L., 2015. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 18, 1183–1189. doi:10.1038/nn.4067
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., Mucke, L., 2011. The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.009
- Morrison, S.F., Madden, C.J., Tupone, D., 2012. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3. doi:10.3389/fendo.2012.00005
- Mosconi, L., Tsui, W.-H., De Santi, S., Li, J., Rusinek, H., Convit, A., Li, Y., Boppana, M., de Leon, M.J., 2005. Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis. *Neurology* 64, 1860–1867. doi:10.1212/01.WNL.0000163856.13524.08
- Most, E.I.S., Scheltens, P., Van Someren, E.J.W., 2012. Increased skin temperature in Alzheimer's disease is associated with sleepiness. *J Neural Transm (Vienna)* 119, 1185–1194. doi:10.1007/s00702-012-0864-1
- 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 abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20, 4050–4058.
- Müller, T.D., Lee, S.J., Jastroch, M., Kabra, D., Stemmer, K., Aichler, M., Abplanalp, B., Ananthakrishnan, G., Bhardwaj, N., Collins, S., Divanovic, S., Endeke, M., Finan, B., Gao, Y., Habegger, K.M., Hembree, J., Heppner, K.M., Hofmann, S., Holland, J., Küchler, D., Kutschke, M., Krishna, R., Lehti, M., Oelkrug, R., Ottaway, N., Perez-Tilve, D., Raver, C., Walch, A.K., Schriever, S.C., Speakman, J., Tseng, Y.-H., Diaz-Meco, M., Pfluger, P.T., Moscat, J., Tschöp, M.H., 2013. p62 links  $\beta$ -adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 469–478. doi:10.1172/JCI64209
- Müller, U.C., Deller, T., Korte, M., 2017. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 281–298. doi:10.1038/nrn.2017.29
- Nakamura, K., Morrison, S.F., 2008. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat. Neurosci.* 11, 62–71. doi:10.1038/nn2027
- Nam, M., Cooper, M.P., 2015. Role of Energy Metabolism in the Brown Fat Gene Program. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 104. doi:10.3389/fendo.2015.00104
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B., 2010. Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, E20–36. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05905.x
- Nedergaard, J., Cannon, B., 2013. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 943–949. doi:10.1016/j.bbali.2013.01.009
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., Cannon, B., 2001. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 82–106.
- Neil, H.A., Dawson, J.A., Baker, J.E., 1986. Risk of hypothermia in elderly patients with diabetes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293, 416–418.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Haroutunian, V., Hof, P.R., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Iwatsubo, T., Jellinger, K.A., Jicha, G.A., Kövari, E., Kukull, W.A., Leverenz, J.B., Love, S., Mackenzie,

- I.R., Mann, D.M., Masliah, E., McKee, A.C., Montine, T.J., Morris, J.C., Schneider, J.A., Sonnen, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Beach, T.G., 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381. doi:10.1097/NEN.0b013e31825018f7
- Neumann, H., Takahashi, K., 2007. Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J. Neuroimmunol.* 184, 92–99. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.11.032
- Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälähti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., Bäckman, L., Hänninen, T., Jula, A., Laatikainen, T., Lindström, J., Mangialasche, F., Paajanen, T., Pajala, S., Peltonen, M., Rauramaa, R., Stigsdotter-Neely, A., Strandberg, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., Kivipelto, M., 2015. A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet* 385, 2255–2263. doi:10.1016/S0140-6736(15)60461-5
- Ni, B., Farrar, J.S., Vaitkus, J.A., Celi, F.S., 2015. Metabolic Effects of FGF-21: Thermoregulation and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 148. doi:10.3389/fendo.2015.00148
- Niccoli, T., Cabecinha, M., Tillmann, A., Kerr, F., Wong, C.T., Cardenas, D., Vincent, A.J., Bettedi, L., Li, L., Grönke, S., Dols, J., Partridge, L., 2016. Increased Glucose Transport into Neurons Rescues A $\beta$  Toxicity in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 26, 2291–2300. doi:10.1016/j.cub.2016.07.017
- Nicholson, R.M., Kusne, Y., Nowak, L.A., LaFerla, F.M., Reiman, E.M., Valla, J., 2010. Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain Res.* 1347, 179–185. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.084
- Nicolakakis, N., Aboukassim, T., Ongali, B., Lecrux, C., Fernandes, P., Rosa-Neto, P., Tong, X.-K., Hamel, E., 2008. Complete rescue of cerebrovascular function in aged Alzheimer's disease transgenic mice by antioxidants and pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist. *Neurobiology of Disease* 28, 9287–9296. doi:10.1523/JNEUROSCI.3348-08.2008
- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, S.G., Carlson, G.A., Iadecola, C., 2002. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of Disease* 9, 61–68. doi:10.1006/nbdi.2001.0460
- Norton, S., Matthews, F.E., Barnes, D.E., Yaffe, K., Brayne, C., 2014. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol* 13, 788–794. doi:10.1016/S1474-4422(14)70136-X
- 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 beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129–10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., LaFerla, F.M., 2003a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *NBA* 24, 1063–1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003b. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39, 409–421. doi:10.1016/S0896-6273(03)00434-3
- Ohta, Y., Tremblay, C., Schneider, J.A., Bennett, Calon, F., Julien, J.-P., 2014. Interaction of transactive response DNA binding protein 43 with nuclear factor  $\kappa$ B in mild cognitive impairment with episodic memory deficits. *Acta Neuropathol Commun* 2, 37. doi:10.1186/2051-5960-2-37
- Okamura, N., Harada, R., Ishiki, A., Kikuchi, A., Nakamura, T., Kudo, Y., 2018. The development and validation of tau PET tracers: current status and future directions. *Clin Transl Imaging* 6, 305–316. doi:10.1007/s40336-018-0290-y
- Okawa, M., Mishima, K., Hishikawa, Y., Hozumi, S., Hori, H., Takahashi, K., 1991. Circadian rhythm disorders in sleep-waking and body temperature in elderly patients with dementia and their treatment. *Sleep* 14, 478–485.
- Olabarria, M., Noristani, H.N., Verkhratsky, A., Rodríguez, J.J., 2010. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58, 831–838.



doi:10.1002/glia.20967

- Ono, K., Condron, M.M., Teplow, D.B., 2009. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14745–14750. doi:10.1073/pnas.0905127106
- Ootsuka, Y., Blessing, W.W., Steiner, A.A., Romanovsky, A.A., 2008. Fever response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, R1294–303. doi:10.1152/ajpregu.00709.2007
- Ootsuka, Y., de Menezes, R.C., Zaretsky, D.V., Alimoradian, A., Hunt, J., Stefanidis, A., Oldfield, B.J., Blessing, W.W., 2009. Brown adipose tissue thermogenesis heats brain and body as part of the brain-coordinated ultradian basic rest-activity cycle. *Neuroscience* 164, 849–861. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.013
- Ootsuka, Y., Kulasekara, K., de Menezes, R.C., Blessing, W.W., 2011. SR59230A, a beta-3 adrenoceptor antagonist, inhibits ultradian brown adipose tissue thermogenesis and interrupts associated episodic brain and body heating. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R987–94. doi:10.1152/ajpregu.00085.2011
- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M.E., Oikonen, V., Noponen, T., Viljanen, T., Scheinin, M., Taittonen, M., Niemi, T., Enerbäck, S., Virtanen, K.A., 2011. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metabolism* 14, 272–279. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.012
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., Breteler, M.M., 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53, 1937–1942.
- Ouellet, V., Routhier-Labadie, A., Bellemare, W., Lakhali-Chaieb, L., Turcotte, E., Carpentier, A.C., Richard, D., 2011. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 192–199. doi:10.1210/jc.2010-0989
- Pakkenberg, B., Pelvig, D., Marnier, L., Bundgaard, M.J., Gundersen, H.J.G., Nyengaard, J.R., Regeur, L., 2003. Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol.* 38, 95–99.
- Pan, X.-D., Zhu, Y.-G., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q.-Y., Huang, H.-P., Chen, X.-C., 2011. Microglial phagocytosis induced by fibrillar  $\beta$ -amyloid is attenuated by oligomeric  $\beta$ -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 6, 45. doi:10.1186/1750-1326-6-45
- Pant, M., Bal, N.C., Periasamy, M., 2015. Cold adaptation overrides developmental regulation of sarcolipin expression in mice skeletal muscle: SOS for muscle-based thermogenesis? *J. Exp. Biol.* 218, 2321–2325. doi:10.1242/jeb.119164
- Papon, M.-A., Whittington, R.A., El-Khoury, N.B., Planel, E., 2011. Alzheimer's disease and anesthesia. *Front Neurosci* 4, 272. doi:10.3389/fnins.2010.00272
- Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1959–1972. doi:10.1038/jcbfm.2012.126
- Pasinetti, G.M., Wang, J., Porter, S., Ho, L., 2011. Caloric intake, dietary lifestyles, macronutrient composition, and alzheimer' disease dementia. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011, 806293–12. doi:10.4061/2011/806293
- Paspalas, C.D., Carlyle, B.C., Leslie, S., Preuss, T.M., Crimins, J.L., Huttner, A.J., van Dyck, C.H., Rosene, D.L., Nairn, A.C., Arnsten, A.F.T., 2018. The aged rhesus macaque manifests Braak stage III/IV Alzheimer's-like pathology. *Alzheimers Dement* 14, 680–691. doi:10.1016/j.jalz.2017.11.005
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., Viswanath, V., 2003. Sensory systems: ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 529–539. doi:10.1038/nrn1141
- Peila, R., Rodriguez, B.L., Launer, L.J., Honolulu-Asia Aging Study, 2002. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes* 51, 1256–1262.
- Perry, T.A., Greig, N.H., 2004. A new Alzheimer's disease interventive strategy: GLP-1. *Curr Drug Targets* 5, 565–571.
- Petersen, R.C., 2018. How early can we diagnose Alzheimer disease (and is it sufficient)? The 2017 Wartenberg lecture. *Neurology* 91, 395–402. doi:10.1212/WNL.0000000000006088
- Petry, F.R., Pelletier, J., Bretteville, A., Morin, F., Calon, F., Hébert, S.S., Whittington, R.A., Planel, E., 2014. Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and

- solutions. 9, e94251. doi:10.1371/journal.pone.0094251
- Pfannenberger, C., Werner, M.K., Ripkens, S., Stef, I., Deckert, A., Schmadl, M., Reimold, M., Häring, H.-U., Claussen, C.D., Stefan, N., 2010. Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* 59, 1789–1793. doi:10.2337/db10-0004
- Phillips, M.C., 2014. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* 66, 616–623. doi:10.1002/iub.1314
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Kauppinen, R., Sandholm, J., Tanila, H., Koistinaho, M., 2011. Multiple cellular and molecular mechanisms are involved in human A $\beta$  clearance by transplanted adult astrocytes. *Glia* 59, 1643–1657. doi:10.1002/glia.21212
- Planel, E., Bretteville, A., Liu, L., Virag, L., Du, A.L., Yu, W.H., Dickson, D.W., Whittington, R.A., Duff, K.E., 2009. Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB J.* 23, 2595–2604. doi:10.1096/fj.08-122424
- Planel, E., Krishnamurthy, P., Miyasaka, T., Liu, L., Herman, M., Kumar, A., Bretteville, A., Figueroa, H.Y., Yu, W.H., Whittington, R.A., Davies, P., Takashima, A., Nixon, R.A., Duff, K.E., 2008. Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability in vivo. *J Neurosci* 28, 12798–12807. doi:10.1523/JNEUROSCI.4101-08.2008
- Planel, E., Miyasaka, T., Launey, T., Chui, D.-H., Tanemura, K., Sato, S., Murayama, O., Ishiguro, K., Tatebayashi, Y., Takashima, A., 2004. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2401–2411. doi:10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004
- Planel, E., Richter, K.E.G., Nolan, C.E., Finley, J.E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J.B., Nelson, R.B., Lau, L.-F., Duff, K.E., 2007. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27, 3090–3097. doi:10.1523/JNEUROSCI.4854-06.2007
- Planel, E., Yasutake, K., Fujita, S.C., Ishiguro, K., 2001. Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J. Biol. Chem.* 276, 34298–34306. doi:10.1074/jbc.M102780200
- Poher, A.-L., Veyrat-Durebex, C., Altirriba, J., Montet, X., Colin, D.J., Caillon, A., Lyautey, J., Rohner-Jeanrenaud, F., 2015. Ectopic UCP1 Overexpression in White Adipose Tissue Improves Insulin Sensitivity in Lou/C Rats, a Model of Obesity Resistance. *Diabetes* 64, 3700–3712. doi:10.2337/db15-0210
- Porter, D.W., Irwin, N., Flatt, P.R., Hölscher, C., Gault, V.A., 2011. Prolonged GIP receptor activation improves cognitive function, hippocampal synaptic plasticity and glucose homeostasis in high-fat fed mice. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 688–693. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.059
- Prinz, P.N., Moe, K.E., Vitiello, M.V., Marks, A.L., Larsen, L.H., 1992. Entrained body temperature rhythms are similar in mild Alzheimer's disease, geriatric onset depression, and normal aging. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 5, 65–71.
- Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P., Faraone, S.V., 2010. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol. Psychiatry* 67, 505–512. doi:10.1016/j.biopsych.2009.02.013
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., Arancio, O., 2014. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem. Pharmacol.* 88, 450–467. doi:10.1016/j.bcp.2014.01.011
- Qu, Z., Jiao, Z., Sun, X., Zhao, Y., Ren, J., Xu, G., 2011. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res.* 1383, 300–306. doi:10.1016/j.brainres.2011.01.084
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344. doi:10.1056/NEJMra0909142
- Rajasekar, N., Nath, C., Hanif, K., Shukla, R., 2017. Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. *Life Sci.* 173, 1–10. doi:10.1016/j.lfs.2016.09.020

- Rajasekar, N., Nath, C., Hanif, K., Shukla, R., 2016. Intranasal Insulin Administration Ameliorates Streptozotocin (ICV)-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Memory Impairment in Rats. *Mol. Neurobiol.* 52, 975–16. doi:10.1007/s12035-016-0169-8
- Rajendran, L., Paolicelli, R.C., 2018. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 38, 2911–2919. doi:10.1523/JNEUROSCI.1136-17.2017
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Ransohoff, R.M., Engelhardt, B., 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 623–635. doi:10.1038/nri3265
- Ravussin, Y., Xiao, C., Gavrilova, O., Reitman, M.L., 2014. Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy homeostasis in mice. 9, e85876. doi:10.1371/journal.pone.0085876
- Refinetti, R., Menaker, M., 1992. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol. Behav.* 51, 613–637.
- Reimúndez, A., Fernández-Peña, C., García, G., Fernández, R., Ordás, P., Gallego, R., Pardo-Vazquez, J.L., Arce, V., Viana, F., Señaris, R., 2018. Deletion of the Cold Thermoreceptor TRPM8 Increases Heat Loss and Food Intake Leading to Reduced Body Temperature and Obesity in Mice. *J Neurosci* 38, 3643–3656. doi:10.1523/JNEUROSCI.3002-17.2018
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R., 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 7, 137–152. doi:10.1038/nrneurol.2011.2
- Reitz, C., Tang, M.-X., Manly, J., Mayeux, R., Luchsinger, J.A., 2007. Hypertension and the risk of mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 64, 1734–1740. doi:10.1001/archneur.64.12.1734
- Reitz, C., Tang, M.-X., Schupf, N., Manly, J.J., Mayeux, R., Luchsinger, J.A., 2010. A summary risk score for the prediction of Alzheimer disease in elderly persons. *Arch. Neurol.* 67, 835–841. doi:10.1001/archneurol.2010.136
- Ren, Y., Sahara, N., 2013. Characteristics of tau oligomers. *Front Neurol* 4, 102. doi:10.3389/fneur.2013.00102
- Rendell, M.S., Kirchain, W.R., 2000. Pharmacotherapy of type 2 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 34, 878–895.
- Richard, D., 2015. Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 11, 489–501. doi:10.1038/nrendo.2015.103
- Richard, D., Carpentier, A.C., Doré, G., Ouellet, V., Picard, F., 2010. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)* 34 Suppl 2, S59–66. doi:10.1038/ijo.2010.241
- Richard, D., Picard, F., 2011. Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 1233–1260.
- Richard, J.E., López-Ferreras, L., Chanclón, B., Eerola, K., Micallef, P., Skibicka, K.P., Wernstedt Asterholm, I., 2017. CNS  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation regulates feeding behavior, white fat browning, and body weight. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 313, E344–E358. doi:10.1152/ajpendo.00418.2016
- Richardson, D., Tyra, J., McCray, A., 1992. Attenuation of the cutaneous vasoconstrictor response to cold in elderly men. *J Gerontol* 47, M211–4.
- Rickle, A., Bogdanovic, N., Volkman, I., Winblad, B., Ravid, R., Cowburn, R.F., 2004. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 15, 955–959.
- Ridge, P.G., Ebbert, M.T.W., Kauwe, J.S.K., 2013. Genetics of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2013, 254954. doi:10.1155/2013/254954
- Rivera, E.J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J.R., la Monte, de, S.M., 2005. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers Dis.* 8, 247–268.
- Rizzo, M.R., Mari, D., Barbieri, M., Ragno, E., Grella, R., Provenzano, R., Villa, I., Esposito, K., Giugliano, D., Paolisso, G., 2005. Resting metabolic rate and respiratory quotient in human longevity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 409–413. doi:10.1210/jc.2004-0390
- Roberts-Toler, C., O'Neill, B.T., Cypess, A.M., 2015. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 23, 1765–1770. doi:10.1002/oby.21134
- Robinson, J.L., Geser, F., Corrada, M.M., Berlau, D.J., Arnold, S.E., Lee, V.M.Y., Kawas, C.H., Trojanowski,

- J.Q., 2011. Neocortical and hippocampal amyloid- $\beta$  and tau measures associate with dementia in the oldest-old. *Brain* 134, 3708–3715. doi:10.1093/brain/awr308
- Rocca, W.A., Grossardt, B.R., Shuster, L.T., 2011a. Oophorectomy, menopause, estrogen treatment, and cognitive aging: clinical evidence for a window of opportunity. *Brain Res.* 1379, 188–198. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.031
- Rocca, W.A., Petersen, R.C., Knopman, D.S., Hebert, L.E., Evans, D.A., Hall, K.S., Gao, S., Unverzagt, F.W., Langa, K.M., Larson, E.B., White, L.R., 2011b. Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimers Dement* 7, 80–93. doi:10.1016/j.jalz.2010.11.002
- Rogers, N.H., 2014. Brown adipose tissue during puberty and with aging. *Ann. Med.* 1–8. doi:10.3109/07853890.2014.914807
- Rohn, T.T., 2013. The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: “TREM-ming” the inflammatory component associated with Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 860959–8. doi:10.1155/2013/860959
- Roses, A.D., Saunders, A.M., Lutz, M.W., Zhang, N., Hariri, A.R., Asin, K.E., Crenshaw, D.G., Budur, K., Burns, D.K., Brannan, S.K., 2014. New applications of disease genetics and pharmacogenetics to drug development. *Curr Opin Pharmacol* 14, 81–89. doi:10.1016/j.coph.2013.12.002
- Rowland, L.A., Bal, N.C., Kozak, L.P., Periasamy, M., 2015. Uncoupling Protein 1 and Sarcolipin Are Required to Maintain Optimal Thermogenesis, and Loss of Both Systems Compromises Survival of Mice under Cold Stress. *J. Biol. Chem.* 290, 12282–12289. doi:10.1074/jbc.M115.637603
- Royea, J., Zhang, L., Tong, X.-K., Hamel, E., 2017. Angiotensin IV Receptors Mediate the Cognitive and Cerebrovascular Benefits of Losartan in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 37, 5562–5573. doi:10.1523/JNEUROSCI.0329-17.2017
- Ruitenbergh, A., Ott, A., van Swieten, J.C., Hofman, A., Breteler, M.M., 2001. Incidence of dementia: does gender make a difference? *NBA* 22, 575–580.
- Ruiz, H.H., Chi, T., Shin, A.C., Lindtner, C., Hsieh, W., Ehrlich, M., Gandy, S., Buettner, C., 2016. Increased susceptibility to metabolic dysregulation in a mouse model of Alzheimer's disease is associated with impaired hypothalamic insulin signaling and elevated BCAA levels. *Alzheimers Dement* 12, 851–861. doi:10.1016/j.jalz.2016.01.008
- Run, X., Liang, Z., Gong, C.-X., 2010. Anesthetics and tau protein: animal model studies. *J. Alzheimers Dis.* 22 Suppl 3, 49–55. doi:10.3233/JAD-2010-100813
- Run, X., Liang, Z., Zhang, L., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C.-X., 2009. Anesthesia induces phosphorylation of tau. *J. Alzheimers Dis.* 16, 619–626. doi:10.3233/JAD-2009-1003
- Sa-Nguanmoo, P., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., 2016a. Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain. *Metab Brain Dis* 31, 239–248. doi:10.1007/s11011-015-9789-3
- Sa-Nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Satjaritanun, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Prachayasakul, W., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., 2016b. FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Horm Behav* 85, 86–95. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.08.006
- Saely, C.H., Geiger, K., Drexel, H., 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58, 15–23. doi:10.1159/000321319
- Sajadi, A., Provost, C., Pham, B., Brouillette, J., 2016. Neurodegeneration in an Animal Model of Chronic Amyloid-beta Oligomer Infusion Is Counteracted by Antibody Treatment Infused with Osmotic Pumps. *J Vis Exp* e54215. doi:10.3791/54215
- Sando, S.B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., Aasly, J., 2008. Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 23, 1156–1162. doi:10.1002/gps.2043
- Sarruf, D.A., Thaler, J.P., Morton, G.J., German, J., Fischer, J.D., Ogimoto, K., Schwartz, M.W., 2010. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 59, 1817–1824. doi:10.2337/db09-1878
- Satlin, A., Volicer, L., Stopa, E.G., Harper, D., 1995. Circadian locomotor activity and core-body temperature

- rhythms in Alzheimer's disease. *NBA* 16, 765–771.
- Satlin, A., Wang, J., Logovinsky, V., Berry, S., Swanson, C., Dhadda, S., Berry, D.A., 2016. Design of a Bayesian adaptive phase 2 proof-of-concept trial for BAN2401, a putative disease-modifying monoclonal antibody for the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 2, 1–12. doi:10.1016/j.trci.2016.01.001
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., De Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., Van der Flier, W.M., 2016. Alzheimer's disease. *Lancet* 388, 505–517. doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1
- Schlein, C., Talukdar, S., Heine, M., Fischer, A.W., Krott, L.M., Nilsson, S.K., Brenner, M.B., Heeren, J., Scheja, L., 2016. FGF21 Lowers Plasma Triglycerides by Accelerating Lipoprotein Catabolism in White and Brown Adipose Tissues. *Cell Metabolism* 23, 441–453. doi:10.1016/j.cmet.2016.01.006
- Schneider, J.A., Arvanitakis, Z., Leurgans, S.E., Bennett, 2009. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 66, 200–208. doi:10.1002/ana.21706
- Schneider, J.A., Bennett, 2010. Where vascular meets neurodegenerative disease. *Stroke* 41, S144–6. doi:10.1161/STROKEAHA.110.598326
- Schrauwen, P., van Marken Lichtenbelt, W.D., 2016. Combatting type 2 diabetes by turning up the heat. *Diabetologia* 59, 2269–2279. doi:10.1007/s00125-016-4068-3
- Scott, A.R., Bennett, T., Macdonald, I.A., 1987. Diabetes mellitus and thermoregulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 1365–1376.
- Selkoe, D.J., Hardy, J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595–608. doi:10.15252/emmm.201606210
- Sergeant, N., Delacourte, A., Buée, L., 2005. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 179–197. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.020
- Serot, J.M., Christmann, D., Dubost, T., Couturier, M., 1997. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 63, 506–508. doi:10.1136/jnnp.63.4.506
- Serrano-Pozo, A., Mielke, M.L., Gómez-Isla, T., Betensky, R.A., Growdon, J.H., Frosch, M.P., Hyman, B.T., 2011. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology* 179, 1373–1384. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.047
- Shah, N.S., Vidal, J.-S., Masaki, K., Petrovitch, H., Ross, G.W., Tilley, C., DeMattos, R.B., Tracy, R.P., White, L.R., Launer, L.J., 2012. Midlife blood pressure, plasma  $\beta$ -amyloid, and the risk for Alzheimer disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension* 59, 780–786. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.178962
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842. doi:10.1038/nm1782
- Shemesh, E., Rudich, A., Harman-Boehm, I., Cukierman-Yaffe, T., 2012. Effect of intranasal insulin on cognitive function: a systematic review. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 366–376. doi:10.1210/jc.2011-1802
- Shi, L., Zhang, Z., Li, L., Hölscher, C., 2017. A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. *Behav. Brain Res.* 327, 65–74. doi:10.1016/j.bbr.2017.03.032
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E., Tong, Q., 2005. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 13560–13567. doi:10.1074/jbc.M414670200
- Shi, Y., Yamada, K., Liddelow, S.A., Smith, S.T., Zhao, L., Luo, W., Tsai, R.M., Spina, S., Grinberg, L.T., Rojas, J.C., Gallardo, G., Wang, K., Roh, J., Robinson, G., Finn, M.B., Jiang, H., Sullivan, P.M., Baufeld, C., Wood, M.W., Sutphen, C., McCue, L., Xiong, C., Del-Aguila, J.L., Morris, J.C., Cruchaga, C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Fagan, A.M., Miller, B.L., Boxer, A.L., Seeley, W.W., Butovsky, O., Barres, B.A., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2017. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 549, 523–527. doi:10.1038/nature24016
- Shih, Y.-H., Wu, S.-Y., Yu, M., Huang, S.-H., Lee, C.-W., Jiang, M.-J., Lin, P.-Y., Yang, T.-T., Kuo, Y.-M.,

2018. Hypertension Accelerates Alzheimer's Disease-Related Pathologies in Pigs and 3xTg Mice. *Front Aging Neurosci* 10, 73. doi:10.3389/fnagi.2018.00073
- Shin, D.G., Kim, H.W., Yoon, S.J., Song, S.H., Kim, Y.H., Lee, Y.G., Joo, K.J., Bae, J.H., Kang, T.W., Jeong, S.J., Woo, S.H., Yoo, E.S., Son, H., Koo, K.C., Kim, S.W., 2019. Mirabegron as a treatment for overactive bladder symptoms in men (MIRACLE study): Efficacy and safety results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel comparison phase IV study. *Neurourol. Urodyn.* 38, 295–304. doi:10.1002/nau.23852
- Shineman, D.W., Basi, G.S., Bizon, J.L., Colton, C.A., Greenberg, B.D., Hollister, B.A., Lincecum, J., Leblanc, G.G., Lee, L.B.H., Luo, F., Morgan, D., Morse, I., Refolo, L.M., Riddell, D.R., Searce-Levie, K., Sweeney, P., Yrjänheikki, J., Fillit, H.M., 2011. Accelerating drug discovery for Alzheimer's disease: best practices for preclinical animal studies. *Alzheimers Res Ther* 3, 28. doi:10.1186/alzrt90
- Shulman, K.I., 2000. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? *Int J Geriatr Psychiatry* 15, 548–561.
- Silva, J.E., 2006. Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiol. Rev.* 86, 435–464. doi:10.1152/physrev.00009.2005
- Simard, P.M., Atgié, C., Mauriège, P., D'Allaire, F., Bukowiecki, L.J., 1994. Comparison of the lipolytic effects of norepinephrine and BRL 37344 in rat brown and white adipocytes. *Obes. Res.* 2, 424–431.
- Simpson, I.A., Carruthers, A., Vannucci, S.J., 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600521
- Simpson, I.A., Chundu, K.R., Davies-Hill, T., Honer, W.G., Davies, P., 1994. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 35, 546–551. doi:10.1002/ana.410350507
- Sindi, S., Mangialasche, F., Kivipelto, M., 2015. Advances in the prevention of Alzheimer's Disease. *F1000Prime Rep* 7, 50. doi:10.12703/P7-50
- Sisodia, S.S., St George-Hyslop, P.H., 2002. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 281–290. doi:10.1038/nrn785
- Skaper, S.D., 2012. Alzheimer's disease and amyloid: culprit or coincidence? *Int. Rev. Neurobiol.* 102, 277–316. doi:10.1016/B978-0-12-386986-9.00011-9
- Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Crain, B.J., Bell, J.M., Bissette, G., Nemeroff, C.B., 1990. Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2452–2455.
- Smith, C.J., Johnson, J.M., 2016. Responses to hyperthermia. Optimizing heat dissipation by convection and evaporation: Neural control of skin blood flow and sweating in humans. *Auton Neurosci* 196, 25–36. doi:10.1016/j.autneu.2016.01.002
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Solomon, A., Mangialasche, F., Richard, E., Andrieu, S., Bennett, D.A., Breteler, M., Fratiglioni, L., Hooshmand, B., Khachaturian, A.S., Schneider, L.S., Skoog, I., Kivipelto, M., 2014. Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. *J. Intern. Med.* 275, 229–250. doi:10.1111/joim.12178
- Song, K., Wang, H., Kamm, G.B., Pohle, J., Reis, F. de C., Heppenstall, P., Wende, H., Siemens, J., 2016. The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* 353, 1393–1398. doi:10.1126/science.aaf7537
- Sonnen, J.A., Larson, E.B., Brickell, K., Crane, P.K., Woltjer, R., Montine, T.J., Craft, S., 2009. Different patterns of cerebral injury in dementia with or without diabetes. *Arch. Neurol.* 66, 315–322. doi:10.1001/archneurol.2008.579
- Speakman, J.R., Keijer, J., 2013. Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. *Molecular Metabolism* 2, 5–9. doi:10.1016/j.molmet.2012.10.002
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G., Shaw, C.E., 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668–1672. doi:10.1126/science.1154584

- St-Amour, I., Bosoi, C.R., Paré, I., Doss, P.M.I.A., Rangachari, M., Hébert, S.S., Bazin, R., Calon, F., 2019. Peripheral adaptive immunity of the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease 1–12. doi:10.1186/s12974-018-1380-5
- St-Amour, I., Cicchetti, F., Calon, F., 2016. Immunotherapies in Alzheimer's disease: Too much, too little, too late or off-target? *Acta Neuropathol* 131, 481–504. doi:10.1007/s00401-015-1518-9
- St-Amour, I., Paré, I., Alata, W., Coulombe, K., Ringuette-Goulet, C., Drouin-Ouellet, J., Vandal, M., Soulet, D., Bazin, R., Calon, F., 2013. Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1983–1992. doi:10.1038/jcbfm.2013.160
- St-Amour, I., Paré, I., Tremblay, C., Coulombe, K., Bazin, R., Calon, F., 2014. IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and A $\beta$  pathology. *J Neuroinflammation* 11, 54. doi:10.1186/1742-2094-11-54
- St-Amour, I., Turgeon, A., Goupil, C., Planel, E., Hébert, S.S., 2017. Co-occurrence of mixed proteinopathies in late-stage Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 1–17. doi:10.1007/s00401-017-1786-7
- Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., Hirshman, M.F., Tseng, Y.-H., Goodyear, L.J., 2013. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 123, 215–223. doi:10.1172/JCI62308
- Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., la Monte, de, S.M., 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.* 7, 63–80.
- Steiner, A.A., Ivanov, A.I., Serrats, J., Hosokawa, H., Phayre, A.N., Robbins, J.R., Roberts, J.L., Kobayashi, S., Matsumura, K., Sawchenko, P.E., Romanovsky, A.A., 2006. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* 4, e284. doi:10.1371/journal.pbio.0040284
- Stemmelin, J., Cohen, C., Terranova, J.-P., Lopez-Grancha, M., Pichat, P., Bergis, O., Decobert, M., Santucci, V., Françon, D., Alonso, R., Stahl, S.M., Keane, P., Avenet, P., Scatton, B., Le Fur, G., Griebel, G., 2008. Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 574–587. doi:10.1038/sj.npp.1301424
- Sterniczuk, R., Dyck, R.H., LaFerla, F.M., Antle, M.C., 2010. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. *Brain Res.* 1348, 139–148. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.013
- Stieler, J.T., Bullmann, T., Kohl, F., Tøien, Ø., Brückner, M.K., Härtig, W., Barnes, B.M., Arendt, T., 2011. The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation. *PLoS One* 6, e14530. doi:10.1371/journal.pone.0014530
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., Carmeliet, P., 2004. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 26, 943–954. doi:10.1002/bies.20092
- Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.-S., Bechmann, I., 2009. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118, 475–485. doi:10.1007/s00401-009-0556-6
- Sugarek, N.J., 1986. Temperature lowering after iced water. Enhanced effects in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 34, 526–529.
- Summers, R.J., Papaioannou, M., Harris, S., Evans, B.A., 1995. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 116, 2547–2548.
- Sun, H.D., Malabunga, M., Tonra, J.R., DiRenzo, R., Carrick, F.E., Zheng, H., Berthoud, H.-R., McGuinness, O.P., Shen, J., Bohlen, P., Leibel, R.L., Kussie, P., 2007. Monoclonal antibody antagonists of hypothalamic FGFR1 cause potent but reversible hypophagia and weight loss in rodents and monkeys. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E964–76. doi:10.1152/ajpendo.00089.2006
- Sund-Levander, M., Grodzinsky, E., 2013. Assessment of body temperature measurement options. *Br J Nurs* 22, 942–944–50. doi:10.12968/bjon.2013.22.16.942
- Sund-Levander, M., Wahren, L.K., 2002. The impact of ADL status, dementia and body mass index on normal body temperature in elderly nursing home residents. *Arch Gerontol Geriatr* 35, 161–169.
- Swaminathan, S.K., Ahlschwede, K.M., Sarma, V., Curran, G.L., Omtri, R.S., Decklever, T., Lowe, V.J.,

- Poduslo, J.F., Kandimalla, K.K., 2017. Insulin differentially affects the distribution kinetics of amyloid beta 40 and 42 in plasma and brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 271678X17709709. doi:10.1177/0271678X17709709
- Sweeney, M.D., Montagne, A., Sagare, A.P., Nation, D.A., Schneider, L.S., Chui, H.C., Harrington, M.G., Pa, J., Law, M., Wang, D.J.J., Jacobs, R.E., Doubal, F.N., Ramirez, J., Black, S.E., Nedergaard, M., Benveniste, H., Dichgans, M., Iadecola, C., Love, S., Bath, P.M., Markus, H.S., Salzman, R.A., Allan, S.M., Quinn, T.J., Kalaria, R.N., Werring, D.J., Carare, R.O., Touyz, R.M., Williams, S.C.R., Moskowitz, M.A., Katusic, Z.S., Lutz, S.E., Lazarov, O., Minshall, R.D., Rehman, J., Davis, T.P., Wellington, C.L., González, H.M., Yuan, C., Lockhart, S.N., Hughes, T.M., Chen, C.L.H., Sachdev, P., O'Brien, J.T., Skoog, I., Pantoni, L., Gustafson, D.R., Biessels, G.J., Wallin, A., Smith, E.E., Mok, V., Wong, A., Passmore, P., Barkof, F., Muller, M., Breteler, M.M.B., Roman, G.C., Hamel, E., Seshadri, S., Gottesman, R.F., van Buchem, M.A., Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Drewes, L.R., Hachinski, V., Finch, C.E., Toga, A.W., Wardlaw, J.M., Zlokovic, B.V., 2019. Vascular dysfunction-The disregarded partner of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 15, 158–167. doi:10.1016/j.jalz.2018.07.222
- Szentirmai, É., Kapás, L., 2017. The role of the brown adipose tissue in  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation-induced sleep, metabolic and feeding responses. *Nature Publishing Group* 7, 958. doi:10.1038/s41598-017-01047-1
- Tai, J., Liu, W., Li, Y., Li, L., Hölscher, C., 2018. Neuroprotective effects of a triple GLP-1/GIP/glucagon receptor agonist in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1678, 64–74. doi:10.1016/j.brainres.2017.10.012
- Takashima, A., 2006. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 309–317.
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Rakugi, H., Morishita, R., 2010. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A $\beta$  deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7036–7041. doi:10.1073/pnas.1000645107
- Talan, M., 1997. Age-related changes in thermoregulation of mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 813, 95–100.
- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wolf, B.A., Bennett, Trojanowski, J.Q., Arnold, S.E., 2012. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338. doi:10.1172/JCI59903
- Tamburella, A., Micale, V., Leggio, G.M., Drago, F., 2010. The beta3 adrenoceptor agonist, amibegron (SR58611A) counteracts stress-induced behavioral and neurochemical changes. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 704–713. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.04.006
- Tan, W., Cao, X., Wang, J., Lv, H., Wu, B., Ma, H., 2010. Tau hyperphosphorylation is associated with memory impairment after exposure to 1.5% isoflurane without temperature maintenance in rats. *Eur J Anaesthesiol* 27, 835–841. doi:10.1097/EJA.0b013e32833a6561
- Tanaka, N., Tamai, T., Mukaiyama, H., Hirabayashi, A., Muranaka, H., Ishikawa, T., Kobayashi, J., Akahane, S., Akahane, M., 2003. Relationship between stereochemistry and the beta3-adrenoceptor agonistic activity of 4'-hydroxynorephedrine derivative as an agent for treatment of frequent urination and urinary incontinence. *J. Med. Chem.* 46, 105–112. doi:10.1021/jm020177z
- Tanzi, R.E., 2012. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006296–a006296. doi:10.1101/cshperspect.a006296
- Tatelman, H.M., Talan, M.I., 1990. Metabolic heat production during repeated cold stress in adult and aged male C57BL/6J mice. *J Gerontol* 45, B215–9.
- Taylor, N.A.S., 2014. Human heat adaptation. *Compr Physiol* 4, 325–365. doi:10.1002/cphy.c130022
- Taylor, S.L., Trudeau, D., Arnold, B., Wang, J., Gerrow, K., Summerfeldt, K., Holmes, A., Zamani, A., Brocardo, P.S., Brown, C.E., 2015. VEGF can protect against blood brain barrier dysfunction, dendritic spine loss and spatial memory impairment in an experimental model of diabetes. *Neurobiology of Disease* 78, 1–11. doi:10.1016/j.nbd.2015.03.022



- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580. doi:10.1002/ana.410300410
- Terwel, D., Lasrado, R., Snauwaert, J., Vandeweerdt, E., Van Haesendonck, C., Borghgraef, P., Van Leuven, F., 2005. Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280, 3963–3973. doi:10.1074/jbc.M409876200
- Therriault, P., ElAli, A., Rivest, S., 2016. High fat diet exacerbates Alzheimer's disease-related pathology in APP<sup>swe</sup>/PS1 mice. *Oncotarget* 5. doi:10.18632/oncotarget.12179
- Thompson, P.M., Hayashi, K.M., de Zubicaray, G., Janke, A.L., Rose, S.E., Semple, J., Herman, D., Hong, M.S., Dittmer, S.S., Doddrell, D.M., Toga, A.W., 2003. Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23, 994–1005.
- Thorne, R.G., Hanson, L.R., Ross, T.M., Tung, D., Frey, W.H., 2008. Delivery of interferon-beta to the monkey nervous system following intranasal administration. *Neuroscience* 152, 785–797. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.013
- Thorne, R.G., Pronk, G.J., Padmanabhan, V., Frey, W.H., 2004. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127, 481–496. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.029
- Tiran, E., Ferrier, J., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Pezet, S., Lenkei, Z., Tanter, M., 2017. Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med Biol* 43, 1679–1689. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K., Kosaka, K., 2002. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 124, 83–92.
- Tokizawa, K., Yoda, T., Uchida, Y., Kanosue, K., Nagashima, K., 2015. Estimation of the core temperature control during ambient temperature changes and the influence of circadian rhythm and metabolic conditions in mice. *Journal of Thermal Biology* 51, 47–54. doi:10.1016/j.jtherbio.2015.03.005
- Toledo, J.B., Arnold, S.E., Raible, K., Brettschneider, J., Xie, S.X., Grossman, M., Monsell, S.E., Kukull, W.A., Trojanowski, J.Q., 2013. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain* 136, 2697–2706. doi:10.1093/brain/awt188
- Tom, S.E., Hubbard, R.A., Crane, P.K., Haneuse, S.J., Bowen, J., McCormick, W.C., McCurry, S., Larson, E.B., 2015. Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am J Public Health* 105, 408–413. doi:10.2105/AJPH.2014.301935
- Tong, X.-K., Nicolakakis, N., Fernandes, P., Ongali, B., Brouillette, J., Quirion, R., Hamel, E., 2009. Simvastatin improves cerebrovascular function and counters soluble amyloid-beta, inflammation and oxidative stress in aged APP mice. *Neurobiology of Disease* 35, 406–414. doi:10.1016/j.nbd.2009.06.003
- Tong, X.-K., Trigiani, L.J., Hamel, E., 2019. High cholesterol triggers white matter alterations and cognitive deficits in a mouse model of cerebrovascular disease: benefits of simvastatin. *Cell Death Dis* 10, 89. doi:10.1038/s41419-018-1199-0
- Tononi, G., Cirelli, C., 2014. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron* 81, 12–34. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.025
- Torosyan, N., Sethanandha, C., Grill, J.D., Dilley, M.L., Lee, J., Cummings, J.L., Ossinalde, C., Silverman, D.H., 2018. Changes in regional cerebral blood flow associated with a 45 day course of the ketogenic agent, caprylidene, in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: Results of a randomized, double-blinded, pilot study. *Exp. Gerontol.* 111, 118–121. doi:10.1016/j.exger.2018.07.009
- Torrent, L., Ferrer, I., 2012. PP2A and Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* 9, 248–256.
- Touitou, Y., Reinberg, A., Bogdan, A., Auzéby, A., Beck, H., Touitou, C., 1986. Age-related changes in both circadian and seasonal rhythms of rectal temperature with special reference to senile dementia of Alzheimer type. *Gerontology* 32, 110–118.

- Tournissac, M., Bourassa, P., Martinez-Cano, R.D., Vu, T.-M., Hébert, S.S., Planel, E., Calon, F., 2019. Repeated cold exposures protect a mouse model of Alzheimer's disease against cold-induced tau phosphorylation. *Molecular Metabolism* 22, 110–120. doi:10.1016/j.molmet.2019.01.008
- Tournissac, M., Vandal, M., Francois, A., Planel, E., Calon, F., 2017. Old age potentiates cold-induced tau phosphorylation: linking thermoregulatory deficit with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 50, 25–29. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.024
- Tournissac, M., Vandal, M., Tremblay, C., Bourassa, P., Vancassel, S., Emond, V., Gangloff, A., Calon, F., 2018. Dietary intake of branched-chain amino acids in a mouse model of Alzheimer's disease: Effects on survival, behavior, and neuropathology. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4, 677–687. doi:10.1016/j.trci.2018.10.005
- Traversy, M.-T., Vandal, M., Tremblay, C., Tournissac, M., Giguère-Rancourt, A., Bennett, A.D., Calon, F., 2016. Altered cerebral insulin response in transgenic mice expressing the epsilon-4 allele of the human apolipoprotein E gene. *Psychoneuroendocrinology* 77, 203–210. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.11.028
- Tremblay, C., Francois, A., Delay, C., Freland, L., Vandal, M., Bennett, Calon, F., 2017. Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* doi:10.1093/jnen/nlw109
- Tremblay, C., Pilote, M., Phivilay, A., Emond, V., Bennett, Calon, F., 2007. Biochemical characterization of Abeta and tau pathologies in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 12, 377–390.
- Tremblay, C., St-Amour, I., Schneider, J., Bennett, Calon, F., 2011. Accumulation of transactive response DNA binding protein 43 in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 788–798. doi:10.1097/NEN.0b013e31822c62cf
- Trinh, N.-H., Hoblyn, J., Mohanty, S., Yaffe, K., 2003. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA* 289, 210–216.
- Turnbull, I.R., Gilfillan, S., Cella, M., Aoshi, T., Miller, M., Piccio, L., Hernandez, M., Colonna, M., 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol.* 177, 3520–3524.
- Tyan, S.-H., Shih, A.Y.-J., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P.R., Koo, E.H., Dickstein, D.L., 2012. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell. Neurosci.* 51, 43–52. doi:10.1016/j.mcn.2012.07.009
- U Din, M., Raiko, J., Saari, T., Kudomi, N., Tolvanen, T., Oikonen, V., Teuho, J., Sipilä, H.T., Savisto, N., Parkkola, R., Nuutila, P., Virtanen, K.A., 2016. Human brown adipose tissue [(15)O]O2 PET imaging in the presence and absence of cold stimulus. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 43, 1878–1886. doi:10.1007/s00259-016-3364-y
- Ulland, T.K., Colonna, M., 2018. TREM2 - a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 14, 667–675. doi:10.1038/s41582-018-0072-1
- Ursino, M.G., Vasina, V., Raschi, E., Crema, F., De Ponti, F., 2009. The beta3-adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives. *Pharmacol. Res.* 59, 221–234. doi:10.1016/j.phrs.2009.01.002
- Valls-Pedret, C., Sala-Vila, A., Serra-Mir, M., Corella, D., la Torre, de, R., Martínez-González, M.Á., Martínez-Lapiscina, E.H., Fitó, M., Pérez-Heras, A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Ros, E., 2015. Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med* 175, 1094–1103. doi:10.1001/jamainternmed.2015.1668
- van der Lans, A.A.J.J., Hoeks, J., Brans, B., Vijgen, G.H.E.J., Visser, M.G.W., Vosselman, M.J., Hansen, J., Jörgensen, J.A., Wu, J., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., van Marken Lichtenbelt, W.D., 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 3395–3403. doi:10.1172/JCI68993
- van der Lee, S.J., Teunissen, C.E., Pool, R., Shipley, M.J., Teumer, A., Chouraki, V., van Lent, D.M., Tynkkynen, J., Fischer, K., Hernessniemi, J., Haller, T., Singh-Manoux, A., Verhoeven, A., Willemsen, G., de Leeuw, F.A., Wagner, H., van Dongen, J., Hertel, J., Budde, K., van Dijk, K.W., Weinhold, L., Ikram, M.A., Pietzner, M., Perola, M., Wagner, M., Friedrich, N., Slagboom, P.E., Scheltens, P., Yang, Q., Gertzen, R.E., Egert, S., Li, S., Hankemeier, T., van Beijsterveldt, C.E.M., Vasan, R.S., Maier, W.,

- Peeters, C.F.W., Grabe, H.J., Ramirez, A., Seshadri, S., Metspalu, A., Kivimäki, M., Salomaa, V., Demirkan, A., Boomsma, D.I., van der Flier, W.M., Amin, N., van Duijn, C.M., 2018. Circulating metabolites and general cognitive ability and dementia: Evidence from 11 cohort studies. *Alzheimer's & Dementia* 14, 707–722. doi:10.1016/j.jalz.2017.11.012
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommel, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., Teule, G.J.J., 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508. doi:10.1056/NEJMoa0808718
- Van Someren, E.J.W., Raymann, R.J.E.M., Scherder, E.J.A., Daanen, H.A.M., Swaab, D.F., 2002. Circadian and age-related modulation of thermoreception and temperature regulation: mechanisms and functional implications. *Ageing Research Reviews* 1, 721–778.
- Vandal, M., Alata, W., Tremblay, C., Rioux-Perreault, C., Salem, N., Calon, F., Plourde, M., 2014a. Reduction in DHA transport to the brain of mice expressing human APOE4 compared to APOE2. *Journal of Neurochemistry* 129, 516–526. doi:10.1111/jnc.12640
- Vandal, M., Bourassa, P., Calon, F., 2015a. Can insulin signaling pathways be targeted to transport A $\beta$  out of the brain? *Front Aging Neurosci* 7, 114. doi:10.3389/fnagi.2015.00114
- Vandal, M., White, P.J., Chevrier, G., Tremblay, C., St-Amour, I., Planel, E., Marette, A., Calon, F., 2015b. Age-dependent impairment of glucose tolerance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 29, 4273–4284. doi:10.1096/fj.14-268482
- Vandal, M., White, P.J., Tournissac, M., Tremblay, C., St-Amour, I., Drouin-Ouellet, J., Bousquet, M., Traversy, M.-T., Planel, E., Marette, A., Calon, F., 2016. Impaired thermoregulation and beneficial effects of thermoneutrality in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 43, 47–57. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.024
- Vandal, M., White, P.J., Tremblay, C., St-Amour, I., Chevrier, G., Emond, V., Lefrançois, D., Virgili, J., Planel, E., Giguere, Y., Marette, A., Calon, F., 2014b. Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain a $\beta$  and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes* 63, 4291–4301. doi:10.2337/db14-0375
- Vassar, R., 2014. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 6, 89. doi:10.1186/s13195-014-0089-7
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Vaughan, C.H., Zarebidaki, E., Ehlen, J.C., Bartness, T.J., 2014. Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Meth. Enzymol.* 537, 199–225. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00011-2
- Verdile, G., Keane, K.N., Cruzat, V.F., Medic, S., Sabale, M., Rowles, J., Wijesekara, N., Martins, R.N., Fraser, P.E., Newsholme, P., 2015. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm.* 2015, 105828–17. doi:10.1155/2015/105828
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., Giralt, M., 2017. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 13, 26–35. doi:10.1038/nrendo.2016.136
- Viola, K.L., Klein, W.L., 2015. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 129, 183–206. doi:10.1007/s00401-015-1386-3
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., Nuutila, P., 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518–1525. doi:10.1056/NEJMoa0808949
- Vogel-Ciernia, A., Wood, M.A., 2014. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci* 69, 8.31.1–17. doi:10.1002/0471142301.ns0831s69
- Volicer, L., Harper, D.G., Manning, B.C., Goldstein, R., Satlin, A., 2001. Sundowning and circadian rhythms in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 158, 704–711. doi:10.1176/appi.ajp.158.5.704

- Walker, J.M., Dixit, S., Saulsberry, A.C., May, J.M., Harrison, F.E., 2017. Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response,  $\beta$ -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 100, 87–98. doi:10.1016/j.nbd.2017.01.004
- Walter, E.J., Carraretto, M., 2016. The neurological and cognitive consequences of hyperthermia. *Crit Care* 20, 199. doi:10.1186/s13054-016-1376-4
- Wang, J., Ho, L., Chen, L., Zhao, Z., Zhao, W., Qian, X., Humala, N., Seror, I., Bartholomew, S., Rosendorff, C., Pasinetti, G.M., 2007. Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 117, 3393–3402. doi:10.1172/JCI31547
- Wang, J., Santa-Maria, I., Ho, L., Ksiezak-Reding, H., Ono, K., Teplow, D.B., Pasinetti, G.M., 2010. Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 22, 653–661. doi:10.3233/JAD-2010-101074
- Wang, J.-H., Wu, Y.-J., Tee, B.L., Lo, R.Y., 2018. Medical Comorbidity in Alzheimer's Disease: A Nested Case-Control Study. *J. Alzheimers Dis.* 63, 773–781. doi:10.3233/JAD-170786
- Wang, J.-Z., Xia, Y.-Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2013. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J. Alzheimers Dis.* 33 Suppl 1, S123–39. doi:10.3233/JAD-2012-129031
- Wang, P., Xie, Z.-H., Guo, Y.-J., Zhao, C.-P., Jiang, H., Song, Y., Zhu, Z.-Y., Lai, C., Xu, S.-L., Bi, J.-Z., 2011. VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 620–626. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.003
- Wang, Q., Yuan, J., Yu, Z., Lin, L., Jiang, Y., Cao, Z., Zhuang, P., Whalen, M.J., Song, B., Wang, X.-J., Li, X., Lo, E.H., Xu, Y., Wang, X., 2018. FGF21 Attenuates High-Fat Diet-Induced Cognitive Impairment via Metabolic Regulation and Anti-inflammation of Obese Mice. *Mol. Neurobiol.* 55, 4702–4717. doi:10.1007/s12035-017-0663-7
- Wang, T.-Y., Liu, C., Wang, A., Sun, Q., 2015. Intermittent cold exposure improves glucose homeostasis associated with brown and white adipose tissues in mice. *Life Sci.* 139, 153–159. doi:10.1016/j.lfs.2015.07.030
- Wang, Z., Leng, Y., Wang, J., Liao, H.-M., Bergman, J., Leeds, P., Kozikowski, A., Chuang, D.-M., 2016. Tubastatin A, an HDAC6 inhibitor, alleviates stroke-induced brain infarction and functional deficits: potential roles of  $\alpha$ -tubulin acetylation and FGF-21 up-regulation. *Scientific Reports* 6, 19626 EP –. doi:10.1038/srep19626
- Warner, A., Rahman, A., Solsjö, P., Gottschling, K., Davis, B., Vennström, B., Arner, A., Mittag, J., 2013. Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 16241–16246. doi:10.1073/pnas.1310300110
- Watson, G.S., Cholerton, B.A., Reger, M.A., Baker, L.D., Plymate, S.R., Asthana, S., Fishel, M.A., Kulstad, J.J., Green, P.S., Cook, D.G., Kahn, S.E., Keeling, M.L., Craft, S., 2005. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* 13, 950–958. doi:10.1176/appi.ajgp.13.11.950
- Webster, B., Hansen, L., Adame, A., Crews, L., Torrance, M., Thal, L., Masliah, E., 2006. Astroglial activation of extracellular-regulated kinase in early stages of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 142–151. doi:10.1097/01.jnen.0000199599.63204.6f
- Weinert, D., 2010. Circadian temperature variation and ageing. 9, 51–60. doi:10.1016/j.arr.2009.07.003
- Weinert, D., 2000. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol Int* 17, 261–283.
- Weinert, D., Waterhouse, J., Nevill, A., 2004. Changes of Body Temperature and Thermoregulation in the Course of the Ovarian Cycle in Laboratory Mice. *Biological Rhythm Research* 35, 171–185. doi:10.1080/09291010412331335724
- Weintraub, S., Wicklund, A.H., Salmon, D.P., 2012. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006171–a006171. doi:10.1101/cshperspect.a006171
- Weldemichael, D.A., Grossberg, G.T., 2010. Circadian rhythm disturbances in patients with Alzheimer's disease: a review. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2010, 1–9. doi:10.4061/2010/716453
- Weyer, C., Tataranni, P.A., Snitker, S., Danforth, E., Ravussin, E., 1998. Increase in insulin action and fat

- oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes* 47, 1555–1561.
- Whitmer, R.A., Gustafson, D.R., Barrett-Connor, E., Haan, M.N., Gunderson, E.P., Yaffe, K., 2008. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* 71, 1057–1064. doi:10.1212/01.wnl.0000306313.89165.ef
- Whittington, R.A., Papon, M.-A., Chouinard, F., Planel, E., 2010. Hypothermia and Alzheimer's disease neuropathogenic pathways. *Curr Alzheimer Res* 7, 717–725.
- Whittington, R.A., Virag, L., Gratuze, M., Petry, F.R., Noël, A., Poitras, I., Truchetti, G., Marcouiller, F., Papon, M.-A., Khoury, El, N., Wong, K., Bretteville, A., Morin, F., Planel, E., 2015. Dexmedetomidine increases tau phosphorylation under normothermic conditions in vivo and in vitro. *Neurobiol. Aging* 36, 2414–2428. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.002
- Wilhelmus, M.M.M., Otte-Höller, I., van Triel, J.J.J., Veerhuis, R., Maat-Schieman, M.L.C., Bu, G., de Waal, R.M.W., Verbeek, M.M., 2007. Lipoprotein receptor-related protein-1 mediates amyloid-beta-mediated cell death of cerebrovascular cells. *The American Journal of Pathology* 171, 1989–1999. doi:10.2353/ajpath.2007.070050
- Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., Prina, A.M., Winblad, B., Jönsson, L., Liu, Z., Prince, M., 2016. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement.* doi:10.1016/j.jalz.2016.07.150
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., Kivipelto, M., Knapp, M., Mangialasche, F., Melis, R., Nordberg, A., Rikkert, M.O., Qiu, C., Sakmar, T.P., Scheltens, P., Schneider, L.S., Sperling, R., Tjernberg, L.O., Waldemar, G., Wimo, A., Zetterberg, H., 2016. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol* 15, 455–532. doi:10.1016/S1474-4422(16)00062-4
- Winkler, E.A., Nishida, Y., Sagare, A.P., Rege, S.V., Bell, R.D., Perlmutter, D., Sengillo, J.D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A.R., Sullivan, J.S., Zhao, Z., Meiselman, H.J., Wendy, R.B., Soto, J., Abel, E.D., Makshanoff, J., Zuniga, E., De Vivo, D.C., Zlokovic, B.V., 2015. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat. Neurosci.* 18, 521–530. doi:10.1038/nn.3966
- Wolf, A., Bauer, B., Abner, E.L., Ashkenazy-Frolinger, T., Hartz, A.M.S., 2016. A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *PLoS ONE* 11, e0147733. doi:10.1371/journal.pone.0147733
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 2003. Insulin and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 9, 795–800.
- World Health Organization, Federation, W.H., World Stroke Organization, 2011. *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control* 1–164.
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J., 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453–457. doi:10.1038/nm838
- Xiao, C., Goldgof, M., Gavrilova, O., Reitman, M.L., 2015. Anti-obesity and metabolic efficacy of the  $\beta$ 3-adrenergic agonist, CL316243, in mice at thermoneutrality compared to 22°C. *Obesity (Silver Spring)* 23, 1450–1459. doi:10.1002/oby.21124
- Yagi, H., Katoh, S., Akiguchi, I., Takeda, T., 1988. Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res.* 474, 86–93.
- Yamaguchi, O., Kakizaki, H., Homma, Y., Igawa, Y., Takeda, M., Nishizawa, O., Gotoh, M., Yoshida, M., Yokoyama, O., Seki, N., Okitsu, A., Hamada, T., Kobayashi, A., Kuroishi, K., 2018. Long-term safety and efficacy of antimuscarinic add-on therapy in patients with overactive bladder who had a suboptimal response to mirabegron monotherapy: A multicenter, randomized study in Japan (MILAI II study). *Int. J. Urol.* 34, S69. doi:10.1111/iju.13868

- Yarchoan, M., Arnold, S.E., 2014. Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. *Diabetes* 63, 2253–2261. doi:10.2337/db14-0287
- Yoshida, T., Sakane, N., Wakabayashi, Y., Umekawa, T., Kondo, M., 1994. Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. *Life Sci.* 54, 491–498.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2007. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.010
- Young, A.A., Dawson, N.J., 1982. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 392–398.
- Young, A.L., Oxtoby, N.P., Daga, P., Cash, D.M., Fox, N.C., Ourselin, S., Schott, J.M., Alexander, D.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2014. A data-driven model of biomarker changes in sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 137, 2564–2577. doi:10.1093/brain/awu176
- Yu, Z., Lin, L., Jiang, Y., Chin, I., Wang, X., Li, X., Lo, E.H., Wang, X., 2018. Recombinant FGF21 Protects Against Blood-Brain Barrier Leakage Through Nrf2 Upregulation in Type 2 Diabetes Mice. *Mol. Neurobiol.* 1–14. doi:10.1007/s12035-018-1234-2
- Zahodne, L.B., Ornstein, K., Cosentino, S., Devanand, D.P., Stern, Y., 2015. Longitudinal relationships between Alzheimer disease progression and psychosis, depressed mood, and agitation/aggression. *Am J Geriatr Psychiatry* 23, 130–140. doi:10.1016/j.jagp.2013.03.014
- Zhang, Yan, Li, P., Feng, J., Wu, M., 2016. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* 37, 1039–1047. doi:10.1007/s10072-016-2546-5
- Zhang, Ye, Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S.A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B.A., Wu, J.Q., 2014. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34, 11929–11947. doi:10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014
- Zhuang, S., Li, J., Wang, X., Wang, H.-F., Zhang, W.-J., Wang, H.-Y., Xing, C.-M., 2016. Renin-angiotensin system-targeting antihypertensive drugs and risk of vascular cognitive impairment: A meta-analysis. *Neurosci. Lett.* 615, 1–8. doi:10.1016/j.neulet.2016.01.011
- Ziegler-Graham, K., Brookmeyer, R., Johnson, E., Arrighi, H.M., 2008. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. *Alzheimers Dement* 4, 316–323. doi:10.1016/j.jalz.2008.05.2479
- Zissimopoulos, J.M., Barthold, D., Brinton, R.D., Joyce, G., 2017. Sex and Race Differences in the Association Between Statin Use and the Incidence of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 74, 225–232. doi:10.1001/jamaneurol.2016.3783

## **Annexe A : Article publié non inclus dans la thèse**

**Tournissac M**, Vandal M, Tremblay C, Bourassa P, Vancassel S, Émond V, Gangloff A, Calon F. Dietary intake of branched-chain amino acids in a mouse model of Alzheimer's disease: Effects on survival, behavior, and neuropathology. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4, 677–687 (2018).

## **Dietary intake of branched-chain amino acids in a mouse model of Alzheimer's disease: effects on survival, behavior and neuropathology**

Tournissac Marine<sup>1,2,3,4</sup>; Vandal Milene<sup>1,2,3,4</sup>; Tremblay Cyntia<sup>2</sup>; Bourassa Philippe<sup>1,2,3,4</sup>, Vancassel Sylvie<sup>3,5</sup>; Emond Vincent<sup>2,3</sup>, Gangloff Anne<sup>6</sup>; Calon Frederic<sup>1,2,3,4\*</sup>.

<sup>1</sup>Faculty of pharmacy, Laval University, Quebec City, Qc, Canada;

<sup>2</sup>Neuroscience axis, CHU de Québec-Université Laval Research Center, Quebec City, Qc, Canada;

<sup>3</sup>OptiNutriBrain International Associated Laboratory (NutriNeuro France-INAF Canada);

<sup>4</sup>Institute of Nutrition and Functional Foods, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada;

<sup>5</sup>INRA, NutriNeuro UMR INRA 1286, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 Rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux, Cedex, France;

<sup>6</sup>Endocrinology and Nephrology Unit, CHU de Québec Research Centre, Québec, Canada

Key words: Alzheimer's disease; Branched-chain amino acids; 3xTg-AD mice; Dietary protein; Tau pathology.



## Abstract

**Introduction:** High levels of plasmatic branched-chain amino acids (BCAAs), commonly used as dietary supplements, are linked to metabolic risk factors for Alzheimer's disease (AD). BCAAs directly influence amino acid transport to the brain and, therefore, neurotransmitter levels. We thus investigated the impact of BCAAs on AD neuropathology in a mouse model.

**Methods:** 3xTg-AD mice were fed either a control diet or a high-fat diet (HFD) from 6 to 18 months of age. For the last 2 months, dietary BCAA content was adjusted to high (+50%), normal (+0%) or low (-50%).

**Results:** Mice fed BCAA-supplemented HFD displayed higher tau neuropathology and only 4 out of 13 survived. Mice on the low-BCAA diet showed higher threonine and tryptophan cortical levels while performing better on the novel object recognition task.

**Discussion:** These preclinical data underscore a potential risk of combining high-fat and high-BCAA consumption, and possible benefits from BCAA restriction in AD.

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease, and the number of demented patients in the world is predicted to double within the next 15 years because of the aging population [1]. Given the lack of disease-modifying treatments, controlling environmental risk factors remains an attractive opportunity to reduce the incidence of AD [2]. Changing dietary habits has been proposed as a means of delaying the onset of the disease either through direct effects on brain function or indirectly by improving peripheral metabolic determinants [3]. Indeed, common nutrients such as lipids, amino acids, and polyphenols may have significant impact on cognitive performance [4-6]. However, the optimal diet to be used in prevention trials remains to be determined.

Branched-chain amino acids (BCAAs) (leucine, isoleucine, and valine) are essential amino acids, comprising approximately 20% of protein intake. They are commonly used as dietary supplements, doubling the daily intake of those amino acids, to increase muscular mass and recovery after exercise [7,8]. However, a BCAA-related signature is identifiable in a context of metabolic disorders: circulating BCAAs are increased in people suffering from obesity and have been shown to predict insulin resistance and other complications related to metabolic diseases [9,10]. Evidence from metabolomics studies indicate that HFD acts in synergy with BCAA to induce metabolic disorders, at least in animal models [11].

BCAAs enter the CNS via the large neutral amino acids transporter (LAT1) at the blood-brain barrier, where they compete with tryptophan and tyrosine, which are direct precursors to serotonin and dopamine, respectively [12]. Thus, circulating BCAAs can modulate levels of these key neurotransmitters in the brain, thereby altering brain function and behavior [13-16]. Since cognitive impairments observed in AD have been associated with a neurotransmitter imbalance [17], we hypothesize that BCAA intake can modulate AD-like behavior. Indeed, the maple syrup urine disease is a neurometabolic disorder characterized by a toxic accumulation of BCAAs and their metabolites, which leads to severe mental retardation and encephalopathy [18,19].

It is only recently that studies have provided clues to a potential link between BCAAs and AD pathogenesis. A metabolomic analysis from the ADNI cohort recently reported inverse correlations between plasmatic valine concentrations and cognitive deficits, as well as ventricle volume in symptomatic stages [20]. Another

metabolomic study in large prospective cohorts relates higher levels of plasma BCAAs with a lower risk of dementia [21]. Conversely, a genome-wide association study suggests that single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with higher plasma isoleucine levels are positively associated with the risk for developing AD [22]. However, no studies have focused yet on the effect of BCAA consumption on AD pathology. Thus, we investigated the impact of both BCAA supplementation and restriction in old 3xTg-AD mice, an animal model of age-related behavioral impairments and A $\beta$ /tau neuropathologies.

## Methods

### Animals and diets

The 3xTg-AD (APP<sub>swe</sub>, PS1<sub>M146V</sub>, tau<sub>P301L</sub>) mouse model of genetically induced AD-like neuropathology was used in an equal number of males and females in each group. Mice produced at our animal facility received either a control diet (CD; 5% kcal fat) or a high-fat diet (HFD; 60% kcal fat) for a 10-month period starting at the age of 6 months. At 16 months of age, groups of mice were exposed until 18 months to the same diets modified to include high (+50%), normal (+0%) or low (-50%) BCAA content. Table 1 provides a detailed description of the amino acids measured in the diets using gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID, see methods below), while Table S1 contains the list of amino acids added to the formulations. Table S2 shows the description of fatty acids measured in the diets using gas chromatography. Diets were formulated and custom-made by Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ) to ensure uniformity between groups and consistency with our previous studies with the 3xTg-AD mouse [23,24].

All mice were put under deep anesthesia with a ketamine/xylazine injection (100 mg/kg ketamine, 10 mg/kg xylazine) and sacrificed by intracardiac perfusion with 50 ml of ice-cold 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) with a cocktail of inhibitors of phosphatases (sodium pyrophosphate 1 mM and sodium fluoride 50 mM) and proteases (SigmaFast protease inhibitor tablets, Sigma-Aldrich, St-Louis, US) as described elsewhere [23]. Rapidly, one hemisphere of the brain was dissected and frozen at -80°C until processing for Western blot, ELISA, or measurements of amino acids and neurotransmitters. All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Institutional Committee of the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL).

### Biochemical analyses

Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatine kinase (CK), triglycerides and cholesterol were analyzed in plasma from intracardiac blood (centrifuged 5 min, 3000 rpm) sampled just before intracardiac perfusion at sacrifice with a Modular analyzer (Roche). Only samples with more than 100  $\mu$ L of plasma could be analyzed with that method. When the hemolysis level reached more than 50 g/dL, samples were eliminated from the analysis. Creatinine was determined with an ELISA kit (B-Bridge International Inc, Santa Clara, CA, US) according to the manufacturer's instructions.

### Behavioral assessment

Recognition memory and locomotor activity were evaluated with the novel object recognition test and the open field test, respectively, as previously described (see the Supplementary Material) [25].

### Amino acid quantification in diet, plasma and brain

Amino acids in the diets, plasma, and cortex homogenates were analyzed by GC-FID as described in the Supplementary Material [26].

#### **Quantification of monoamines in prefrontal cortex and hippocampus**

Dopamine (DA), serotonin (5-HT), 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA), homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were quantified in the prefrontal cortex and hippocampus of mice by electrochemical high performance liquid chromatography (HPLC) following the detailed method described in the Supplementary Material [27].

#### **Protein extraction and Western immunoblotting**

For Western immunoblotting and  $\beta$ -Amyloid ELISA, proteins were extracted from the parieto-temporal cortex. The protein extraction method results in a TBS-soluble fraction (intracellular and extracellular fraction), a detergent-soluble fraction (membrane fraction) and a detergent-insoluble fraction (insoluble proteins resuspended in formic acid) as previously described [25]. The detailed method for Western immunoblotting is described elsewhere [24]. The list of primary antibodies used in our experiments is available in Supplementary Table S5. Homogenates were generated from the parieto-temporal cortex and were all run on the same gel for each experiment.

#### **A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 quantification**

A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 were measured in TBS-soluble and detergent-insoluble fractions from the parieto-temporal cortex using sensitive human  $\beta$ -Amyloid ELISA kits (Wako, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions, as shown [24]. Plates were read at 450 nm using a Synergy<sup>TM</sup> HT multidetection microplate reader (Biotek, Winooski, VT, US).

#### **Statistics**

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis used and the numbers of mice per group are specified in each Figure or legend. Briefly, one-way (one independent variable) or two-way (two independent variables) ANOVA were used when more than two groups were compared, and were followed by Tukey's post hoc (equal variance). In case of unequal variance, a Dunnett's post hoc was used or a Kruskal-Wallis followed by a Dunn's. The log-rank Mantel-Cox test was used for the analysis of the survival curves. Correlations between variables were investigated using linear regression analyses. All statistical analyses were performed with Prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) or JMP (version 12.1.0; SAS Institute Inc., Cary, IL, US) software and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

To evaluate the impact of BCAAs on AD pathogenesis, 3xTg-AD mice were fed a CD or HFD from 6 to 16 months of age and then either supplemented or restricted in BCAAs by 50% for 2 months (Table 1; Fig. 1A). Because age-related factors are essential to the development of AD [28,29], old 3xTg-AD mice were selected. Experiments were performed in the 3xTg-AD mouse model of AD, which develops behavioral impairments as well as A $\beta$  and tau neuropathologies with age. Animals were exposed to a HFD more representative of

prevalent dietary habits in Western societies [30], and because HFD have been shown to accelerate AD-like pathology [23,24,31,32] and to synergize with BCAAs to induce metabolic disorders [11] in animal models.

#### **BCAA supplementation combined with HFD led to the premature death of two thirds of 3xTg-AD mice**

At the end of the study, only 4 out of 13 mice (30.8%) in the group fed the HFD survived the 2-month supplementation with BCAAs, which is significantly less than the group fed HFD only, in which 10 mice out of 12 (83.3%) survived (Fig. 1B). Interestingly, no mice restricted in BCAAs for the 2-month period died prematurely, regardless of the base diet. While a total of 15 animals from all groups died before the end of the planned study, we were able to sacrifice a few (n=7) in the high-BCAA HFD group while they were in critical states, allowing collection of intracardiac blood and brains as described in the method. These moribund mice fed the combination of HFD and BCAAs (identified with red circles in Figure 1) displayed higher AST, ALT and CK plasmatic concentrations (Fig. 1C, D and E), suggesting major liver, muscular or cardiac damage [33]. A two-way ANOVA revealed that mice fed the HFD, independently of BCAA intake, had lower plasmatic creatinine concentrations, possibly due to reduced hepatic activity, muscle mass, or increased renal function (Fig. 1F) [34]. No differences were found in plasma triglycerides and cholesterol levels between each group (Table S4).

#### **Titration of BCAA supply modifies plasma and brain amino acids and monoamines levels in 18-month-old 3xTg-AD mice**

High BCAA consumption was reported to directly modify levels of plasmatic levels BCAAs and aromatic amino acids in humans [14]. Since tryptophan, threonine, tyrosine, valine, leucine and isoleucine all compete for LAT1 for brain entry, specific changes in circulating amino acids may impact their balance in the brain, as well as downstream monoaminergic neurotransmitters [13,14]. We thus measured levels of amino acids in the plasma and parieto-temporal cortex (Fig. 2). We first confirmed that BCAA restriction decreased valine, leucine and isoleucine concentrations in the plasma in both CD and HFD groups, but not in the cerebral cortex (Fig. 2A,D). Lower BCAA intake also increased the ratio of circulating aromatic amino acids to BCAAs and levels of glycine and tyrosine under both types of diets (Fig. 2B,C). Although a 50% higher consumption of BCAAs was not reflected in significantly higher plasmatic or cortical concentrations, increased asparagine levels were noted in the plasma of mice supplemented with BCAA in either the CD or HFD (Fig. 2C). Moreover, threonine levels were markedly modulated in the brain with higher and lower concentrations following low and high BCAA intake, respectively, whether in CD or HFD (Fig. 2F). Changes in cortical tyrosine levels were not significant, probably due to interindividual variations (Fig. 2F), while cortical concentrations of tryptophan, but not phenylalanine, were inversely associated with levels of BCAAs in the plasma in both CD and HFD (Fig. 2F).

To confirm that modulations in plasmatic and brain amino acids impact neurotransmitter synthesis, we measured catecholamines (dopamine) and indolamines (serotonin) and their metabolites in the prefrontal cortex and hippocampus of the 3xTg-AD mice (Fig. 3). Whereas BCAA intake did not affect dopamine concentrations in 3xTg-AD mice, a trend toward higher serotonin (5-HT) content was observed in both the prefrontal cortex and hippocampus of mice fed a HFD reduced in BCAAs compared with mice fed a HFD only (Fig. 3A,F). In addition, a low BCAA intake led to higher levels of metabolites 5-HIAA and DOPAC in both the prefrontal cortex and hippocampus, compared to the HFD supplemented with BCAAs (Fig. 3B,D,G).

#### **Low BCAA dietary intake improves object recognition memory in old 3xTg-AD mice**

To assess the effect of BCAA dietary intake on memory function, all groups of mice underwent the novel object recognition task at 18 months (Fig. 4A). This test requires minimal movement and induces no anxiety, which makes it a suitable choice for old HFD-fed 3xTg-AD mice [24]. The test first confirmed that 18-month-old 3xTg-AD mice, fed either a CD or a HFD, did not discriminate the novel from the old object (Fig. 4B, C), as previously shown [25]. Similarly, 3xTg-AD mice fed the high-BCAA diet failed to recognize the novel object. In contrast, 3xTg-AD mice fed the low BCAA diets, either CD-low or HFD-low, spent significantly more time exploring the novel than the familiar object, suggesting memory improvement after BCAA restriction. The open field test confirmed that no group of mice demonstrated impaired voluntary locomotor activity, which could have affected exploratory behavior (Fig. 4D). The time the mice spent on a wire confirms that muscular strength was not affected by dietary treatments (Fig. S1). Interestingly, cortical threonine levels were correlated with the recognition index (Fig. 4E).

### **BCAA supplementation in a HFD context worsens tau hyperphosphorylation but not amyloid pathology in old 3xTg-AD mice**

Tau hyperphosphorylation is one of the main neuropathological hallmarks of AD, correlating with cognitive deficits in AD patients [28,35]. Here we found that a 2-month BCAA supplementation combined with HFD was sufficient to increase soluble tau pSer202 (+94%), pSer202/Thr205 (+271%), pThr231 (+680%), and pThr181 (+93%) compared to control mice, without changing the level of total tau (Fig. 5A-D). Strikingly, phosphorylation of detergent-insoluble tau at pSer202 was also increased in the HFD-high group (+151%), while tau pSer396/404 and both total tau and total human tau were unchanged (Fig. 5E-H). In contrast, reducing the BCAAs resulted in a tau phosphorylation status similar to mice fed the CD. However, we did not find any changes in protein levels of main kinases involved in tau phosphorylation (Table S5).

Accumulations of brain A $\beta$  peptides and extracellular plaques is another key marker of AD replicated in the 3xTg-AD mouse [25,28]. However, we did not observe any effect of BCAA consumption on A $\beta$ 40 or A $\beta$ 42 peptides in soluble or detergent-insoluble fractions (Fig. 5I,J). Finally, we found that the cytochrome oxidase protein, a marker of cellular activity, was greatly increased in the cortex of mice fed the HFD supplemented with BCAAs (Fig. 5K). No changes in drebrin (Fig. 5L) or other AD-relevant markers were noted (Table S5).

## **Discussion**

The consumption of high levels of BCAAs is prevalent in our contemporary society, but no study to our knowledge has directly probed for the impact of high or low BCAA intake in a context of AD and old age [8,36]. Correlative data linking BCAA and AD exist [20-22] but conclusions on causality require controlled intervention difficult to achieve in a clinical setting. In this study, 3xTg-AD mice were either supplemented or restricted in BCAA over a CD or HFD from 16 to 18 months of age. We found that BCAA supplementation combined with a HFD resulted in a significant mortality rate and strongly increased tau neuropathology. In contrast, reducing BCAAs in both the CD and HFD did not result in any premature death, improved cognitive performance and led to increased levels of threonine, tryptophan, 5-HT, 5-HIAA and DOPAC in the brain.

### **BCAA toxicity**

A first striking consequence of BCAA supplementation when combined with a HFD was a shortening of the lifespan of 3xTg-AD mice. Rises in plasmatic ALT, AST, and CK were observed in moribund animals and

represent a possible signature of hepatic and muscular toxicity, corroborating previous studies reporting BCAA-induced liver injuries in HFD-fed obese mice, inflammation and oxidative stress [33,37]. Although the cause of death for all the animals included in our study is not definitive, major brain damages (atrophy, edema...) were not observed, suggesting that hepatic and muscular toxicity played a more direct role in their premature death. Although little is known about BCAA metabolism in the elderly, some studies have revealed that the response to BCAA supplementation is different in old age [38]. Thus, 18-month-old 3xTg-AD mice could display a failure in catabolizing BCAAs, disturbing amino acids homeostasis in the brain and peripheral tissues.

### **Modulation of amino acids by BCAA intake: plasma and brain levels**

Our results further confirm that BCAA dietary supply modulates plasma and brain amino acids and catecholamines. Perhaps surprisingly, BCAA supplementation was not accompanied by a significant increase in plasmatic and cortical concentrations in the 3xTg-AD mouse, but rather by higher levels of asparagine in the plasma and lower cortical threonine. It should be kept in mind that the present measurement reflect an equilibrium reached following two-month of altered BCAA intake, which is also affected by other factors such as distribution of amino acids in tissue where they integrate into proteins and elimination (metabolism and renal clearance). Still, BCAA restriction lowered BCAA and increased tyrosine concentrations in the plasma, while in the cortex, levels of threonine and tryptophan were upregulated, suggesting a complex interactions in amino acid homeostasis.

Previous studies have shown that BCAA administration decreases cortical tyrosine and tryptophan in the hippocampus of rats [39]. The likely mechanism is competition for amino acid transporters at the BBB [12]. However, despite obvious trends in the means, no significant change in brain tyrosine content was detected here due to interindividual variation. More clearly, increases and decreases in BCAA intake induced a strong modulation in cortical threonine concentrations, possibly due to the fact that threonine brain uptake is highly sensitive to competition from BCAAs [40]. Finally, although we did not observe a decrease in serotonin following BCAA supplementation as previously reported [15,39], a 2-month reduction in dietary BCAAs combined to a HFD led to a trend toward increased serotonin and dopamine levels. This tendency was supported by significant increases in serotonin metabolite 5-HIAA and dopamine metabolite DOPAC, changes typically interpreted as signs of increased secretion and metabolism of these neurotransmitters [41]. Overall, our results confirm that BCAA dietary supply modulates plasmatic and cerebral amino acids and neurotransmitters, thus providing a means by which they can modify brain homeostasis and function.

### **BCAAs and memory**

The observed failure of 18-month-old 3xTg-AD mice to recognize the novel object is consistent with previous work in the same model at similar ages [5,24,25]. As old transgenic mice already did not recognize the novel object, it was predictable that further deterioration of memory could not be detected at this age even after BCAA supplementation. However, a reduction in BCAA intake improved recognition memory in mice fed either the CD or HFD. These results were intriguing since HFD is known to worsen cognitive defects in 3xTg-AD mice [24]. The observed increase in cortical amino acids and monoamines may underlie these memory improvements, as suggested by the fact that the animals with the higher levels of brain threonine performed better at the novel object recognition task. In particular, threonine, tryptophan, and serotonin are known to be involved in behavioral changes [15,42].

### **BCAAs and AD neuropathology**

BCAAs have been only recently implicated in AD. Plasmatic valine has been linked to cognitive score and brain atrophy in an AD cohort [20], while a recent Mendelian randomization analysis indicate that genetic susceptibility to high plasmatic isoleucine is associated with a higher risk of developing the disease [22]. APP/PS1 mice, a mouse model of amyloid pathology, spontaneously display increased plasmatic BCAAs, without obesity, suggesting that AD pathology potentiates defects in BCAA metabolism, putting AD patients at a higher risk of BCAA-induced brain damages [43,44]. Conversely, tau pathology is one of the major neuropathological markers of AD, strongly associated with ante-mortem cognitive deficits [35,45]. We found that a 2-month BCAA supplementation combined with HFD strongly increased both soluble and detergent-insoluble tau hyperphosphorylation in the cortex of old 3xTg-AD mice. These results suggest that the combination of BCAA supplementation and HFD has synergistic deleterious effects on AD pathology and neuronal function. To our knowledge, it is the first time that BCAA supplementation has been implicated in tau phosphorylation. Although synaptic and amyloid pathologies were unaffected by BCAA modulation, the rise in cytochrome oxidase 1 protein in cortex homogenates of mice under BCAA-supplemented HFD suggests an increase in mitochondrial oxidative activity in those mice, possibly reflecting a state of neuronal oxidative stress [46].

## **Conclusion**

There is scientific evidence that dietary intervention can reduce the risk of developing age-related cognitive impairment or AD [3,47]. Thus, nutritional strategies aimed at reducing AD pathology are of interest in the field. This study provides controlled preclinical data pinpointing the specific role of BCAAs in an animal model of AD. For the first time, our results identify the potential risks of combining high BCAA consumption with a HFD, not only regarding peripheral toxicity, but also with respect to the aggravation of AD-like tau neuropathology. On a more positive note, our results suggest that reducing the BCAA content in the diet supply, while maintaining protein intake, could have a beneficial effect on memory and could be considered in nutritional interventions aimed at improving cognitive performance and/or reducing the incidence of AD. Thus, it would be interesting to test whether protein supplementation with low BCAA concentration could prevent mood and memory impairment. Another easier intervention for the elderly would be to promote foods rich in protein but low in BCAAs [36].

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (FC – MOP 102532 and 125930), the Alzheimer Society Canada (FC), the Institute of Nutrition and Functional Foods, and the Canada Foundation for Innovation (10307). MT is funded by a scholarship from the Alzheimer Society of Canada. FC is a Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S) senior research scholar.

## Figures

	Control 5% (w/w) fat			High fat 35% (w/w) fat		
	Normal	High-BCAA	Low-BCAA	Normal	High-BCAA	Low-BCAA
<b>Protein (% w/w)</b>	20.3	23.3	18.4	27.4	31	25
<b>Carbohydrate (% w/w)</b>	66	63.5	67.5	25.3	24.1	26.1
<b>Fat (% w/w)</b>	5	4.8	5.1	35.1	33.4	36.3
<b>Calorie per diet weight (kcal/g)</b>	3.9	3.9	3.9	5.3	5.2	5.3
<b>Ingredient (g/kg)</b>						
<b>Amino Acids</b>						
L-Cystine	0.2	1.8	2.5	0.4	3.4	5.2
Isoleucine	6.4	16.2	2.9	8.9	22.2	5.3
Leucine	16.3	38.4	7.3	23.3	49.9	14.2
Lysine	15.2	13.2	13.7	22.9	20.2	24.9
Methionine	7.0	4.1	4.5	9.9	6.6	8.4
Phenylalanine	10.3	10.2	11.2	14.8	14.1	21.1
Threonine	5.2	5.0	5.3	7.5	6.8	9.0
Tryptophan <sup>&amp;</sup>	0	1.1	1.3	0	1.1	1.3
Valine	7.4	20.6	3.2	11.6	26.8	6.4
Histidine	4.4	3.8	4.3	7.3	5.7	7.2
Alanine	4.9	5.3	5.2	6.6	5.6	6.7
Arginine <sup>&amp;</sup>	0	3.2	3.9	0	3.2	3.9
Aspartic Acid	9.9	9.0	9.9	14.5	13.3	15.9
Glutamic Acid	40.9	37.1	39.0	55.9	58.8	61.8
Glycine	2.5	3.1	3.3	3.7	4.6	4.9
Proline	16.6	17.2	18.8	23.8	23.8	30.7
Serine	7.4	7.5	7.4	10.7	15.4	12.2
Tyrosine	10.9	10.3	10.3	13.2	12.8	18.3
<b>Total</b>	166	207	154	235	294	257
<b>Corn Starch</b>	150	150	150	25	25	25
<b>Maltodextrin 10</b>	0	0	0	100	100	100
<b>Sucrose</b>	500	500	500	52.5	52.5	52.5
<b>Cellulose, BW200</b>	50	50	50	50	50	50
<b>Corn Oil</b>	30	30	30	0	0	0
<b>Safflower Oil</b>	0	0	0	125	125	125
<b>Lard</b>	0	0	0	135	135	135
<b>Soybean Oil</b>	10	10	10	0	0	0
<b>Canola Oil</b>	10	10	10	0	0	0
<b>Mineral (S19101)</b>	35	35	35	35	35	35
<b>Vitamins (V15908)</b>	10	10	10	10	10	10
<b>Choline Bitartrate</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Cholesterol, USP</b>	0,6	0,6	0,6	3	3	3

Table 1: Description of dietary treatments.

Amino acid content of the diets, accounting for casein and amino acid supplementation, was determined by GC-FID. <sup>&</sup>Arginine cannot be determined with the technique used and tryptophan degrades quickly during acid hydrolysis.



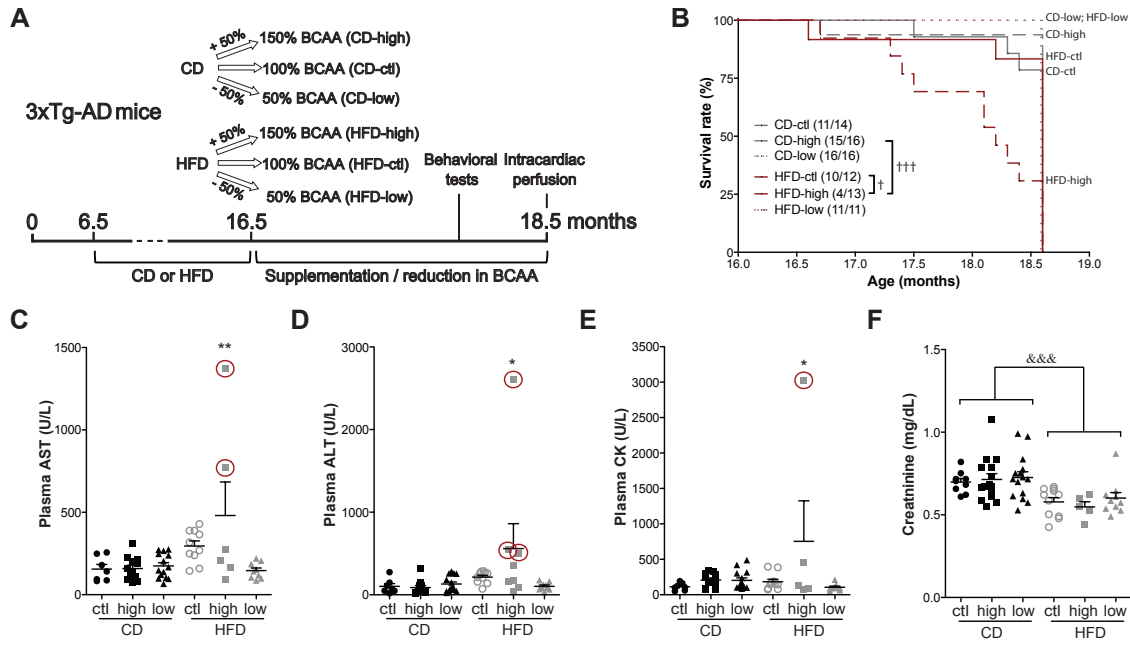
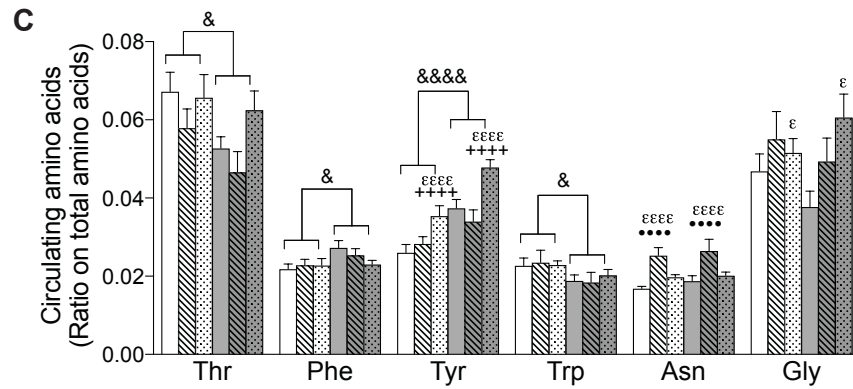
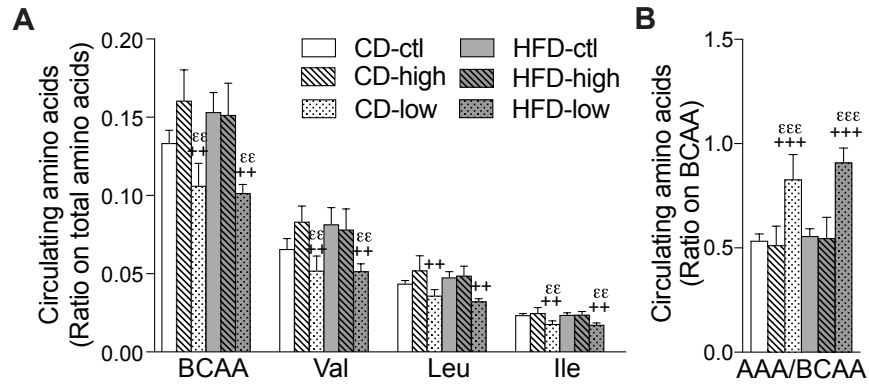


Figure 1: BCAA-supplemented HFD affects the survival of 3xTg-AD mice, increasing hepatic and muscular toxicity.

Timeline of experimentation (A). Survival rate of mice fed the six different diets during a 2-month period (final vertical line indicates sacrifice) (B). Plasmatic concentrations of AST (C), ALT (D), CK (E) and creatinine (F) from intracardiac blood of 18-month-old 3xTg-AD mice sampled just before perfusion. Samples available and analyzed from moribund mice are identified with a red circle. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Mantel-Cox test:  $\dagger p < 0.05$ ,  $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ . One-way ANOVA, Dunnett's (versus CD-ctl) post-hoc analysis:  $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$ . Two-way ANOVA, followed by a Tukey's HSD; effect of the diet:  $\&\& p < 0.001$ . CD: control diet; HFD: high fat diet; ctl: normal levels of BCAAs; high: BCAA-supplemented diet by 50%; low: BCAA-reduced diet by 50%. AST: Aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase, CK: creatine kinase.

**Plasmatic amino acids**



**Cortical amino acids**

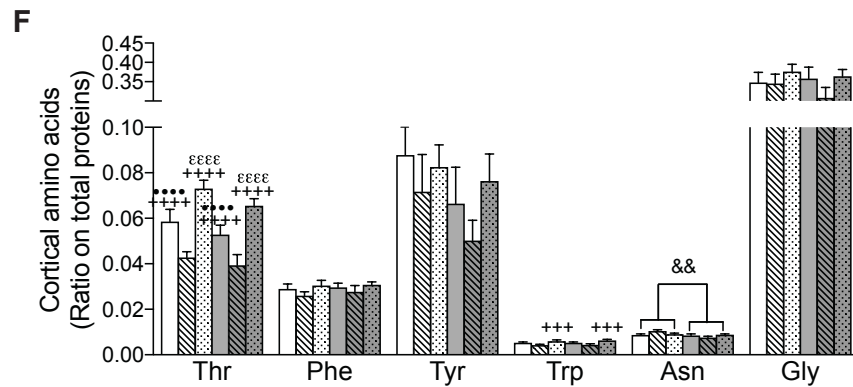
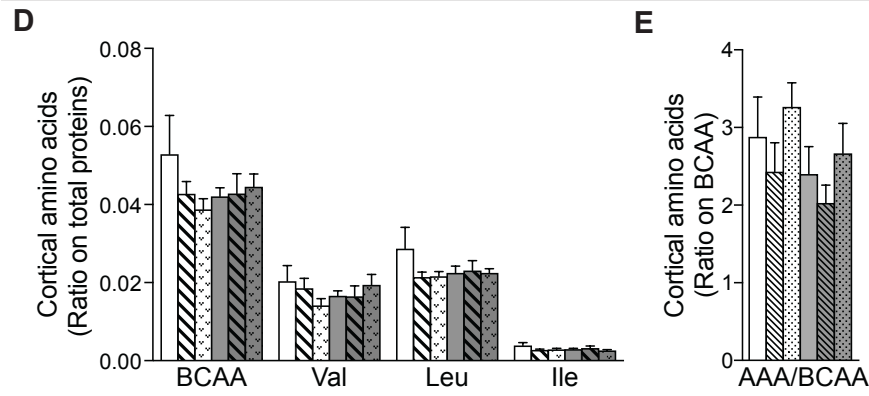
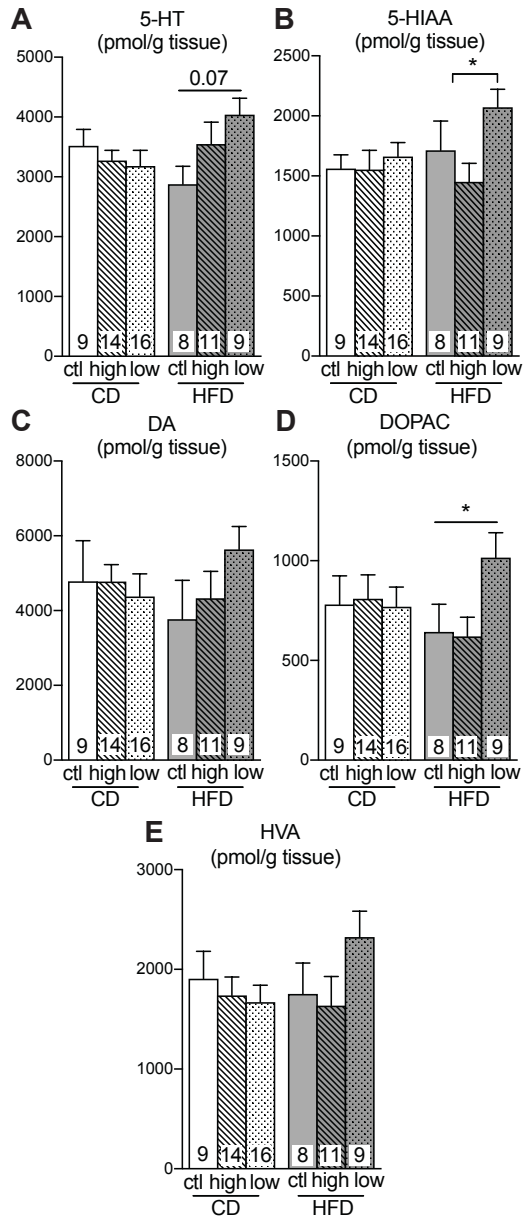


Figure 2: High and low BCAA supplies modify plasmatic and cerebral amino acids levels in 18-month-old 3xTg-AD mice.

BCAA (Val, Leu, Ile) and aromatic (Phe, Trp, Tyr, His) amino acids in intracardiac blood sampled just before perfusion, expressed as a ratio on total plasma amino acids (n= 4-6 per group) (A-C). BCAA and aromatic amino acids in TBS-soluble fraction of cortex homogenates, expressed as a ratio on total protein content (n= 10-16 per group) (D-F). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA, followed by a Tukey's HSD; effect of the diet: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ; effect of BCAA:  $\epsilon$  different from ctl, + different from high,  $\square$  different from low. CD: control diet; HFD: high-fat diet; ctl: normal levels of BCAA; high: BCAA-supplemented diet by 50%; low: BCAA-reduced diet by 50%. AAA: aromatic amino acids.

**Prefrontal cortex**



**Hippocampus**

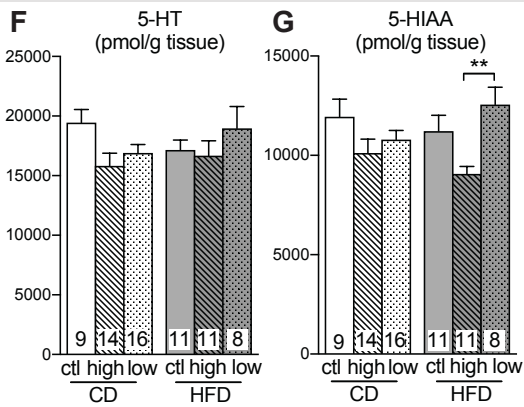


Figure 3: High and low BCAA supplies modify monoamines levels in 18-month-old 3xTg-AD mice. Levels of dopamine and serotonin and their metabolites measured in the prefrontal cortex (A-E) and hippocampus (F,G). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Kruskal-Wallis followed by a Dunn's: \* $p < 0.05$ . CD: control diet; HFD: high-fat diet; ctl: normal levels of BCAAs; high: BCAA-supplemented diet by 50%; low: BCAA-reduced diet by 50%. 5-HT: serotonin; 5-HIAA: 5-hydroxyindolacetic acid; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA: homovanillic acid.

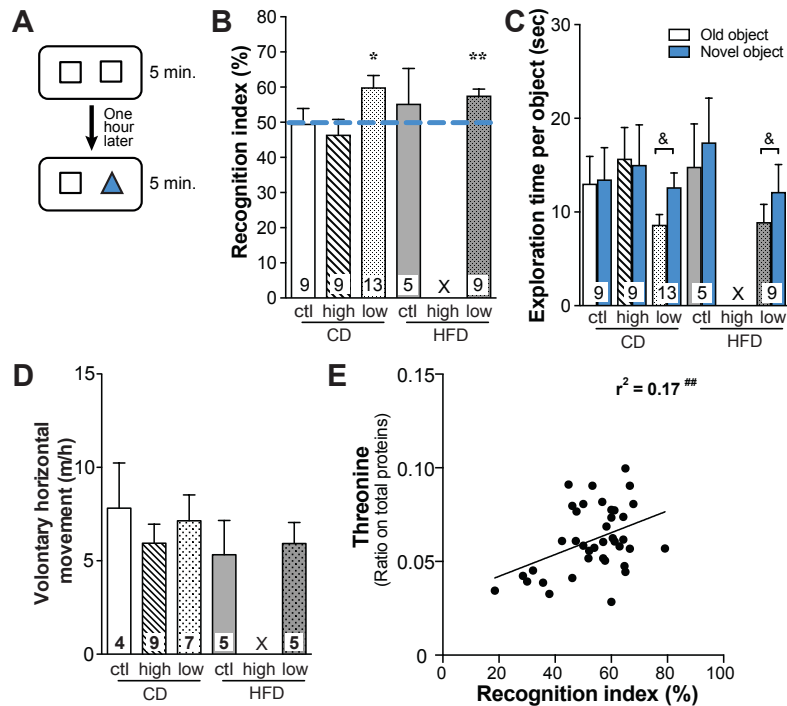


Figure 4: BCAA-reduced diet improves object recognition memory in 18-month-old 3xTg-AD mice. The novel object recognition test paradigm (A). Performance at the novel object recognition task of 18-month-old 3xTg-AD mice determined with the recognition index (= time exploring the novel object / total time exploring both objects) (B) and the time spent exploring the old and the novel object (C). Voluntary horizontal movement (D) measured during a one-hour open field test. Correlation between cortical threonine levels and recognition index of the mice (E). Dotted line represents a recognition index of 50%, meaning the mouse does not discriminate between both objects. Almost all mice under the BCAA-supplemented HFD died before the test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. One-sample t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus random chance (recognition index of 50%). Wilcoxon signed-rank test (non-parametric paired t-test): & $p < 0.05$ . Pearson's coefficient ( $r^2$ ) was determined using linear regression: ## $p < 0.01$ . X: insufficient number of healthy mice. CD: control diet; HFD: high fat diet; ctl: normal levels of BCAA; high: BCAA-supplemented diet by 50%; low: BCAA-reduced diet by 50%.

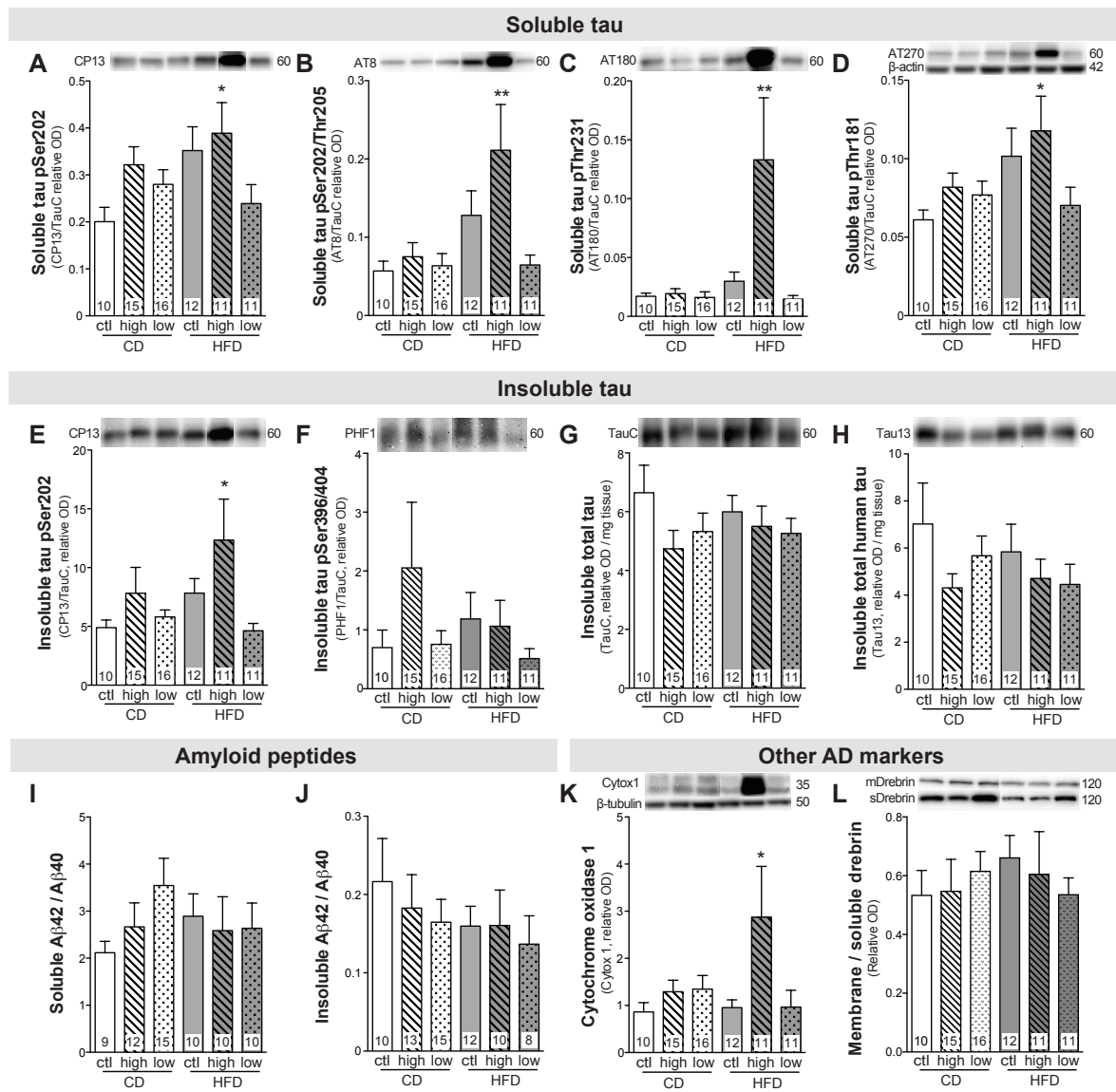


Figure 5: BCAA-supplemented HFD worsens tau pathology but not amyloid pathology in 18-month-old 3xTg-AD mice.

TBS-soluble tau phosphorylation at pSer202, pSer202/Thr205, pThr231, pThr181 (A-D), detergent-insoluble tau phosphorylation at pSer202 and pSer396/404 (E,F), detergent-insoluble total tau and total human tau (G,H), TBS-soluble and detergent-insoluble Aβ42/Aβ40 (I-J), detergent-soluble cytochrome oxidase 1 (K) and ratio of detergent-soluble on TBS-soluble drebrin (L) measured by Western blot in cortex homogenates. Data for tau phosphorylation were calculated as the ratio of the phospho-epitope to total tau concentration. Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA, Dunnett's (vs CDn) post-hoc analysis: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01. Representative bands were selected from nonconsecutive samples run on the same gel. CD: control diet; HFD: high fat diet; ctl: normal levels of BCAA; high: BCAA-supplemented diet by 50%; low: BCAA-reduced diet by 50%. OD: optical density; Aβ: amyloid beta.

## Supplementary data

### Methods

#### *Behavioral assessment*

Recognition memory and locomotor activity were evaluated with the novel object recognition test and the open field test respectively, as previously described [1]. Behavioral tests were performed one week before sacrifice with a recovery time of 16 to 24 hours. For the novel object recognition test, mice were put in a clear box (29.2 cm x 19 cm x 12.7 cm) with two similar objects for 5 minutes and the time exploring or smelling the objects was counted. One hour later, mice were put in the same box changing one (defined as the novel object) of the two objects from the first phase during another 5 minutes. Mice spending less than 7 seconds exploring one of the two objects during the first phase were excluded from the analysis. For the open field test, mice were placed in Plexiglas cages with translucent walls (40 cm x 40 cm) and their voluntary horizontal movements were tracked for one hour by the automated recording of photobeam breaks (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA).

#### *Amino acid quantification in brain, plasma and diet*

All reagents used for cleaning samples and derivatization were included in the EZ:faast kit for free amino acid analysis by GC-FID (Phenomenex, Torrance, CA, USA). This kit also provided the amino acid standard mixtures and internal standard (Norvaline) solution (200 nM each). Prior to diet hydrolysis, about 3 g of each diet were defatted three times with hexane, according to the protocol described previously [2]. This step was made in duplicate. To hydrolyse proteins and peptides, 50 mg of defatted diet was weighed into 18 mL vacuum hydrolysis tubes and 5 mL of HCl 6M was added. Tubes were flushed with N<sub>2</sub> before being sealed under vacuum. Samples were heated at 110°C in a bloc heater for 24 hours. After hydrolysis, 5 mL of NaOH 6 M were added before centrifugation (10 minutes, 4°C, 5100 rpm). An aliquot of the supernatant was diluted 10 times with HCl 0.1 M. Amino acids of plasma, cortex homogenates (TBS-soluble fraction) and diet samples were derivatized using EZ:faast kit for GC-FID (Phenomenex, Torrance, CA, USA) as described in the EZ:faast user's manual. Briefly, 50 µL (plasma) or 100 µL (cortex homogenates and diet) were mixed with 100 µL of Norvaline. This solution was passed through sorbent tips. A washing solution (200 µL) was then pipetted to clean up the samples. Eluting medium (200 µL) permitted to collect the sorbent and derivatized amino acids with 50 µL of Reagent 4 (propyl chloroformate solution). The products of derivatization were then extracted with 100 µL of Reagent 5 (Iso-octane) and 100 µL of Reagent 6 (HCl 1N) were added. Finally, the organic layer was transferred to a GC vial with insert.

Derivatized samples were then analyzed with a GC-FID system (Shimadzu, Kyoto, Japan), constituted of a GC-2010 Plus gas chromatograph equipped with an AOC-20s auto-sampler, an AOC-20i auto-injector and a flame ionization detector. The GC solution software controlled the system. A 2 µL sample was injected to the ZB-AAA 10 m x 0.25 mm id GC column (provided by the EZ:faast kit) with a split ratio of 1:10 (v/v). The column flow was constant at 1.7 mL/minute of hydrogen. Nitrogen (30 mL/minute), hydrogen (40 mL/minute) and air (400 mL/minute) were used as auxiliary gasses for flame ionization detector. The injector was set at 300°C and the detector at 320°C. The oven temperature was initially 110°C, then increased to 320°C at 32°C/min and maintained for 1 minute at this temperature (total run time 7.56 minutes and 2 minutes equilibration). Repeatability in plasma and cortex samples was assessed for each amino acid calculating a mean RSD from 5 samples injected three times.

#### *Quantification of monoamines*

### *Prefrontal cortex*

Dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were quantified by electrochemical high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described [3,4]. Prefrontal cortex were dissected and kept at -80°C until homogenization in 300 µL of an aqueous solution of 12 mM HClO<sub>4</sub>, 0.22 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 3 mM octanesulfonic acid and 56 µM EDTA. After centrifugation (30,000 g, 20 minutes, 4°C), the supernatant was stored at -80°C until analysis. Mobile phase (pH 3.4; 0.1 M sodium acetate, 0.1 M citric acid monohydrate, 1 mM sodium octyl sulfate, 0.1 mM disodium EDTA, 1 mM diethylamine and 125 mL/L acetonitrile) was continuously pumped with a rate of 0.5 mL/minute (Ultimate 3000 pump, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). An analytical column C18, 5 µm particle size, 100x3mm (ACE-121-1003, ACE) was employed to separate the samples and monoamines were detected by an amperometric detector (Decade II) maintained at a potential of +0.75V with an amperage range of 1 nA. Peaks areas were integrated using Chromeleon 6.80 software.

### *Hippocampus*

Half hippocampi (10 mg) were weighed, homogenized in 180 µL of perchloric acid 0.1 N (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA), centrifuged at 4°C for 20 minutes at 16,000 g and kept at -80°C. Twenty µL of the supernatant were injected in duplicate using a Waters 717 plus Autosampler Automatic Injector (Waters, Lachine, QC, Canada) and submitted to HPLC through an Atlantis dC18 column (Waters). The electrochemical detector was set at 5nA and the mobile phase was delivered at 1.4 mL/minute and composed of 47.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9 mM octanesulfonic acid, 0.4 mM ethylenediaminetetra-acetic acid, 2 mM NaCl, and 8% MeOH (Sigma Aldrich) at pH 2.90.

### References

- [1] St-Amour I, Paré I, Tremblay C, Coulombe K, Bazin R, Calon F. IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and A $\beta$  pathology. *J Neuroinflammation* 2014;11:54.
- [2] Robbins RJ, Leonczak J, Johnson JC, Li J, Kwik-Urbe C, Prior RL, et al. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *J Chromatogr A* 2009;1216:4831–40.
- [3] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2014;42:207–17.
- [4] Calon F, Morissette M, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bédard PJ, Di Paolo T. Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov Disord* 2003;18:241–53.



## Figures

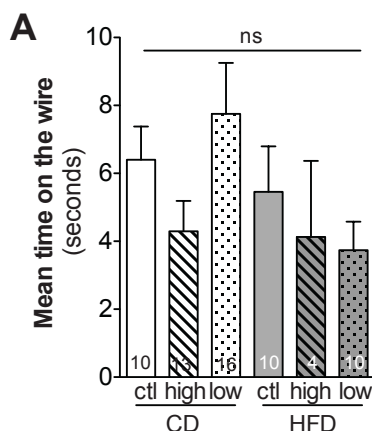


Figure S1: Modulating BCAA intake did not affect muscular strength in 18-month-old 3xTg-AD mice. Effects on muscle strength and muscle mass have been attributed to BCAA. Muscular strength was thus evaluated by the time the mice spent on a wire with their two front legs during a 30 seconds test. Data are shown as mean  $\pm$  SEM and were compared using Kruskal-Wallis followed by a Dunn's post hoc analysis.

Amino Acids (formulation)	Control 5% (w/w) fat			High fat 35% (w/w) fat		
	Normal	High-BCAA	Low-BCAA	Normal	High-BCAA	Low-BCAA
Casein	200	100	87	200	100	87
L-Cystine	0	3.4	4.2	0	3.4	4.2
Isoleucine	0	16.8	0	0	16.8	0
Leucine	0	31.0	0	0	31.0	0
Lysine	0	6.5	8.1	0	6.5	8.1
Methionine	3	2.3	2.9	3	2.3	2.9
Phenylalanine	0	4.4	5.5	0	4.4	5.5
Threonine	0	3.4	4.2	0	3.4	4.2
Tryptophan	0	1.1	1.3	0	1.1	1.3
Valine	0	20	0	0	20	0
Histidine	0	2.3	2.9	0	2.3	2.9
Alanine	0	2.3	2.9	0	2.3	2.9
Arginine	0	3.2	3.9	0	3.2	3.9
Aspartic Acid	0	5.7	7.1	0	5.7	7.1
Glutamic Acid	0	18.4	23	0	18.4	23
Glycine	0	1.6	2	0	1.6	2
Proline	0	10.3	12.9	0	10.3	12.9
Serine	0	4.8	5.9	0	4.8	5.9
Tyrosine	0	4.7	5.8	0	4.7	5.8
<b>Total</b>	<b>203.0</b>	<b>241.9</b>	<b>179.6</b>	<b>203.0</b>	<b>241.9</b>	<b>179.6</b>

Table S1: Amino acids added to the formulation as estimated by Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ). Amino acids actually measured by GC-FID gas chromatography are in Table 1. Casein was the main source of amino acids and adjusted to prepare the high-BCAA and low-BCAA diets. Changes in the total amount of proteins were limited but unavoidable since high-BCAA intake inevitably leads to a higher intake of total proteins.

	Control 5% (w/w) fat			High fat 35% (w/w) fat		
	Normal	High-BCAA	Low-BCAA	Normal	High-BCAA	Low-BCAA
<b>Protein (% w/w)</b>	20.3	23.3	18.4	27.4	31	25
<b>Carbohydrate (% w/w)</b>	66	63.5	67.5	25.3	24.1	26.1
<b>Fat (% w/w)</b>	5	4.8	5.1	35.1	33.4	36.3
<b>Calorie per diet weight (kcal/g)</b>	3.9	3.9	3.9	5.3	5.2	5.3
<b>Fatty acids (g/kg)</b>						
C18:2 n-6 LA	21.6	19.1	23.6	100.8	102.8	104.6
C20:4 n-6 ARA	0	0	0	0.3	0.3	0.3
C22:4 n-6 DTA	0	0	0	0.2	0.1	0.1
<b>Total n-6 PUFA</b>	21.6	19.1	23.6	101.3	103.2	105.0
C18:3 n-3 LNA	1.4	1.3	1.5	1.7	1.7	1.7
C20:5 n-3 EPA	0	0	0	0	0	0
C22:6 n-3 DHA	0	0	0	0	0	0
C22:5 n-3 DPA	0	0	0	0.1	0.1	0.1
<b>Total n-3 PUFA</b>	1.4	1.3	1.5	1.8	1.8	1.8
C18:1 n-9 Oleic acid	14.9	13.7	16.8	57.0	56.5	55.8
C16:1 n-7 Palmitoleic acid	0.1	0.1	0.1	2.1	2.0	2.0
<b>Total MUFA</b>	15.0	13.8	16.9	59.0	58.5	57.8
C14:0 Myristic acid	0.1	0.1	0.1	1.6	1.7	1.7
C16:0 Palmitic acid	4.8	4.3	5.3	31.2	33.3	33.8
C18:0 Stearic acid	1.2	1.1	1.3	16.4	18.1	18.5
<b>Total SFA</b>	6.1	5.5	6.7	49.2	53.1	54.0
<b>Total</b>	44.1	39.7	48.7	211.3	216.6	218.6

Table S2: Description of the different fatty acids present in the diets.

Proteins, carbohydrates and fats are estimated based on ingredients. The content of each fatty acid was measured within the diet by gas chromatography. LA: linoleic acid; ARA: arachidonic acid; DTA: docosatetraenoic acid; DPA: docosapentaenoic acid; PUFA: polyunsaturated fatty acids; LNA:  $\alpha$ -linolenic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; SFA: saturated fatty acids.

	CD (5% w/w fat)						HFD (35% w/w fat)						p value
	Normal (n=10)		High-BCAA (n=15)		Low-BCAA (n=16)		Normal (n=12)		High-BCAA (n=11)		Low-BCAA (n=11)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
<b>Plasmatic amino acids</b>													
Alanine	0.205	± 0.025	0.190	± 0.030	0.209	± 0.026	0.183	± 0.018	0.207	± 0.041	0.201	± 0.025	ns
Serine	0.046	± 0.004	0.050	± 0.008	0.052	± 0.010	0.047	± 0.008	0.045	± 0.004	0.057	± 0.004	ns
Proline	0.043	± 0.012	0.039	± 0.006	0.040	± 0.015	0.038	± 0.010	0.040	± 0.006	0.043	± 0.010	ns
Methionine	0.024	± 0.009	0.017	± 0.004	0.021	± 0.006	0.027	± 0.008	0.017	± 0.005	0.020	± 0.004	ns
Glutamic acid	0.017	± 0.002	0.023	± 0.015	0.024	± 0.006	0.025	± 0.006	0.027	± 0.014	0.018	± 0.006	ns
Glutamine	0.192	± 0.043	0.191	± 0.030	0.202	± 0.036	0.211	± 0.026	0.195	± 0.061	0.185	± 0.018	ns
Lysine	0.110	± 0.012	0.090	± 0.019	0.102	± 0.012	0.090	± 0.015	0.087	± 0.017	0.111	± 0.014	ns
Histidine	0.027	± 0.003	0.026	± 0.004	0.027	± 0.002	0.032	± 0.004	0.030	± 0.012	0.028	± 0.002	ns
<b>Cortical amino acids</b>													
Alanine	0.396	± 0.083	0.368	± 0.081	0.383	± 0.079	0.378	± 0.090	0.333	± 0.077	0.375	± 0.054	ns
Serine	0.709	± 0.190	0.635	± 0.190	0.704	± 0.116	0.632	± 0.189	0.562	± 0.089	0.623	± 0.071	ns
Proline	0.015	± 0.007	0.013	± 0.005	0.016	± 0.006	0.013	± 0.005	0.012	± 0.004	0.015	± 0.005	ns
Aspartic acid	0.828	± 0.177	0.771	± 0.234	0.856	± 0.227	0.794	± 0.312	0.732	± 0.188	0.766	± 0.116	ns
Glutamic acid	1.413	± 0.258	1.405	± 0.308	1.448	± 0.240	1.405	± 0.329	1.225	± 0.246	1.363	± 0.174	ns
Glutamine	1.169	± 0.227	1.065	± 0.152	1.083	± 0.338	1.127	± 0.276	1.14	± 0.435	1.113	± 0.169	ns
Lysine	0.051	± 0.009	0.044	± 0.006	0.049	± 0.009	0.043	± 0.016	0.042	± 0.019	0.045	± 0.007	ns
Histidine	0.011	± 0.003	0.007	± 0.005	0.011	± 0.003	0.013	± 0.005	0.019	± 0.028	0.012	± 0.004	ns

Table S3: Additional amino acids measured in the plasma and cortex of mice.

Plasma: Amino acids were analyzed from intracardiac blood sampled just before perfusion, expressed as a ratio on total plasma amino acids (n= 4-6 per group). Cortex: amino acids were analyzed in TBS-soluble fractions of cortex homogenates, expressed as a ratio on total protein content (n= 10-16 per group).

	CD (5% w/w fat)						HFD (35% w/w fat)						p value
	Normal (n=7)		High-BCAA (n=12)		Low-BCAA (n=14)		Normal (n=10)		High-BCAA (n=6)		Low-BCAA (n=9)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Triglycerides	4.034 ±	2.234	3.659 ±	1.357	4.234 ±	1.540	4.214 ±	1.157	5.537 ±	3.775	3.899 ±	1.276	ns
Cholesterol	0.447 ±	0.320	0.573 ±	0.236	0.639 ±	0.289	0.398 ±	0.134	0.563 ±	0.588	0.396 ±	0.149	ns

Table S4: Impact of the diets on plasma triglycerides and cholesterol levels.

Triglycerides and cholesterol were measured in plasma collected by cardiac puncture. Data were compared using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc analysis.

	CD (5% w/w fat)						HFD (35% w/w fat)						p value
	Normal (n=10)		High-BCAA (n=15)		Low-BCAA (n=16)		Normal (n=12)		High-BCAA (n=11)		Low-BCAA (n=11)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
<b>Synaptic proteins</b>													
Membrane Drebrin	198 ±	106	192 ±	110	258 ±	134	279 ±	122	184 ±	130	216 ±	106	ns
Soluble Drebrin	245 ±	197	172 ±	112	146 ±	90	213 ±	125	225 ±	230	118 ±	121	ns
Septin3	337 ±	128	374 ±	131	380 ±	99	410 ±	154	382 ±	80	415 ±	143	ns
SNAP25	254 ±	131	229 ±	125	250 ±	132	262 ±	139	242 ±	131	252 ±	113	ns
Synaptophysin	315 ±	152	313 ±	111	357 ±	154	368 ±	125	375 ±	161	346 ±	93	ns
PSD95	391 ±	155	405 ±	131	420 ±	111	441 ±	107	354 ±	71	375 ±	104	ns
<b>Kinases</b>													
GSK3β(pSer9) / GSK3β	0.399 ±	0.44	0.571 ±	0.432	0.363 ±	0.378	0.491 ±	0.323	0.538 ±	0.643	0.723 ±	0.857	ns
AKT (pSer473) / AKT	0.301 ±	0.152	0.406 ±	0.277	0.319 ±	0.198	0.451 ±	0.322	0.374 ±	0.316	0.421 ±	0.221	ns
<b>Others</b>													
NeuN	496 ±	104	448 ±	175	493 ±	118	487 ±	148	454 ±	137	370 ±	108	ns
GFAP	362 ±	142	334 ±	126	337 ±	117	326 ±	129	282 ±	107	404 ±	248	ns
p62	143 ±	72	135 ±	58	165 ±	60	165 ±	51	111 ±	52	135 ±	57	ns
mTOR (pSer2448) / mTOR	0.721 ±	0.310	0.889 ±	0.374	0.555 ±	0.391	0.945 ±	0.485	0.765 ±	0.471	0.824 ±	0.325	ns

Table S5: Effect of BCAA intake on cortical levels of others AD markers.

Proteins were measured in TBS-soluble or detergent-soluble (membrane) fractions of cortex homogenates. Data are shown as relative optical density and were compared using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc analysis.

Antibody	Clone	Specificity	Host	Source
Actin	monoclonal	β-actin	Mouse	Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada)
AKT	polyclonal	AKT aa 345-480	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
AKT (phospho)	polyclonal	AKT, phosphorylated at Ser-473	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
β-tubulin	monoclonal	β-tubulin	Mouse	Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada)
Cytox1	monoclonal	Cytochrome oxidase 1	Mouse	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Drebrin	Mx823	c-terminal peptide (aa 632-649)	Mouse	Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany)
GFAP	G-A-5 monoclonal	Whole glial fibrillary acidic protein	Mouse	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
GSK3β	monoclonal	Rat GSK-3β aa. 1-160	Mouse	BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada)
GSK3β (phospho)	polyclonal	GSK3β, phosphorylated at Ser-9	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
mTOR	polyclonal	Total mTOR	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
mTOR (phospho)	monoclonal	mTOR phosphorylated at Ser2448	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
NeuN	polyclonal	aa 1-100 (N-terminal)	Rabbit	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
p62	polyclonal	Endogenous levels of total p62 protein	Rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PSD95	K28/43	PSD95	Mouse	Antibodies Incorporated (Davies, CA, USA)
Septin3	polyclonal	Endogenous levels of total SEPT3 protein	Rabbit	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SNAP25	SM1 81	Whole Snap25	Mouse	Covance, Inc. (Princeton, NJ, USA)
Synaptophysin	monoclonal	Synaptophysin	Mouse	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Tau (total human tau)	Tau 13 monoclonal	Tau protein (Tau13) aa. 2-18 of human tau	Rabbit	Covance, Inc. (Princeton, NJ, USA)
Tau (total)	polyclonal	c-terminal region of tau protein	Rabbit	Dako (Burlington, ON, Canada)
Tau (phospho)	AT8	Tau, phosphorylated at Ser-202 and Thr-205	Mouse	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Tau (phospho)	AT180	Tau, phosphorylated at Thr-231	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
Tau (phospho)	AT270	Tau, phosphorylated at Thr-181	Mouse	Pierce Endogen Inc. (Rockford, IL, USA)
Tau (phospho)	CP13	Tau, phosphorylated at Ser-202	Mouse	Generous gift from Peter Davies
Tau (phospho)	PHF1	Tau, phosphorylated at Ser-396 and Ser-404	Mouse	Generous gift from Peter Davies

Table S6: List of antibodies used in the study for Western blot.

## References

- [1] Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* 2013;9:63–75.e2.
- [2] Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol* 2014;13:788–94.
- [3] Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, Levälähti E, Ahtiluoto S, Antikainen R, et al. A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet* 2015;385:2255–63.
- [4] Kerdiles O, Layé S, Calon F. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain health: Preclinical evidence for the prevention of neurodegenerative diseases. *Trends in Food Science & Technology* 2017;69:203–13.
- [5] Dal-Pan A, Dudonné S, Bourassa P, Bourdoulous M, Tremblay C, Desjardins Y, et al. Cognitive-Enhancing Effects of a Polyphenols-Rich Extract from Fruits without Changes in Neuropathology in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2016;Preprint:1–21.
- [6] van de Rest O, van der Zwaluw NL, de Groot LCPGM. Literature review on the role of dietary protein and amino acids in cognitive functioning and cognitive decline. *Amino Acids* 2013;45:1035–45.
- [7] Ohtani M, Sugita M, Maruyama K. Amino acid mixture improves training efficiency in athletes. *J Nutr* 2006;136:538S–543S.
- [8] Maughan RJ, Depiesse F, Geyer H, International Association of Athletics Federations. The use of dietary supplements by athletes. *J Sports Sci*, vol. 25 Suppl 1, 2007, pp. S103–13.
- [9] Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 2009;9:311–26.
- [10] Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17:448–53.
- [11] Newgard CB. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metabolism* 2012;15:606–14.
- [12] Pardridge WM. Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* 1977;28:103–8.
- [13] Fernstrom JD. Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* 2013;45:419–30.
- [14] Gijsman HJ, Scarnà A, Harmer CJ, McTavish SB, Odontiadis J, Cowen PJ, et al. A dose-finding study on the effects of branch chain amino acids on surrogate markers of brain dopamine function. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;160:192–7.
- [15] Coppola A, Wenner BR, Ilkayeva O, Stevens RD, Maggioni M, Slotkin TA, et al. Branched-chain amino acids alter neurobehavioral function in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;304:E405–13.
- [16] Scaini G, Jeremias GC, Furlanetto CB, Dominghini D, Comim CM, Quevedo J, et al. Behavioral responses in rats submitted to chronic administration of branched-chain amino acids. *JIMD Rep* 2014;13:159–67.
- [17] Xu Y, Yan J, Zhou P, Li J, Gao H, Xia Y, et al. Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2012;97:1–13.
- [18] Zinnanti WJ, Lazovic J. Interrupting the mechanisms of brain injury in a model of maple syrup urine disease encephalopathy. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:71–9.

- [19] Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol* 2014;34:157–65.
- [20] Toledo JB, Arnold M, Kastenmüller G, Chang R, Baillie RA, Han X, et al. Metabolic network failures in Alzheimer's disease: A biochemical road map. *Alzheimers Dement* 2017;13:965–84.
- [21] Tynkkynen J, Chouraki V, van der Lee SJ, Hernesniemi J, Yang Q, Li S, et al. Association of branched-chain amino acids and other circulating metabolites with risk of incident dementia and Alzheimer's disease: A prospective study in eight cohorts. *Alzheimers Dement* 2018.
- [22] Larsson SC, Markus HS. Branched-chain amino acids and Alzheimer's disease: a Mendelian randomization analysis. *Nature Publishing Group* 2017;7:13604.
- [23] Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, et al. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging* 2010;31:1516–31.
- [24] Vandal M, White PJ, Tremblay C, St-Amour I, Chevrier G, Emond V, et al. Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain  $\text{A}\beta$  and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes* 2014;63:4291–301.
- [25] St-Amour I, Paré I, Tremblay C, Coulombe K, Bazin R, Calon F. IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and  $\text{A}\beta$  pathology. *J Neuroinflammation* 2014;11:54.
- [26] Robbins RJ, Leonczak J, Johnson JC, Li J, Kwik-Urbe C, Prior RL, et al. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *J Chromatogr A* 2009;1216:4831–40.
- [27] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2014;42:207–17.
- [28] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010;362:329–44.
- [29] Rocca WA, Petersen RC, Knopman DS, Hebert LE, Evans DA, Hall KS, et al. Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimers Dement* 2011;7:80–93.
- [30] Wang DD, Leung CW, Li Y, Ding EL, Chiuve SE, Hu FB, et al. Trends in dietary quality among adults in the United States, 1999 through 2010. *JAMA Intern Med* 2014;174:1587–95.
- [31] Reitz C, Tang M-X, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA. A summary risk score for the prediction of Alzheimer disease in elderly persons. *Arch Neurol* 2010;67:835–41.
- [32] Theriault P, ElAli A, Rivest S. High fat diet exacerbates Alzheimer's disease-related pathology in APPswe/PS1 mice. *Oncotarget* 2016;5.
- [33] Zhang F, Zhao S, Yan W, Xia Y, Chen X, Wang W, et al. Branched Chain Amino Acids Cause Liver Injury in Obese/Diabetic Mice by Promoting Adipocyte Lipolysis and Inhibiting Hepatic Autophagy. *EBioMedicine* 2016.
- [34] Harita N, Hayashi T, Sato KK, Nakamura Y, Yoneda T, Endo G, et al. Lower serum creatinine is a new risk factor of type 2 diabetes: the Kansai healthcare study. *Diabetes Care* 2009;32:424–6.
- [35] Tremblay C, Francois A, Delay C, Freland L, Vandal M, Bennett, et al. Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017.
- [36] Rajendram R, Preedy VR, Patel VB. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*. Springer; 2014.

- [37] Zhenyukh O, Civantos E, Ruiz-Ortega M, Sánchez MS, Vázquez C, Peiró C, et al. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic Biol Med* 2017;104:165–77.
- [38] Tatpati LL, Irving BA, Tom A, Bigelow ML, Klaus K, Short KR, et al. The effect of branched chain amino acids on skeletal muscle mitochondrial function in young and elderly adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:894–902.
- [39] Choi S, Disilvio B, Fernstrom MH, Fernstrom JD. Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. *Amino Acids* 2013;45:1133–42.
- [40] Tovar A, Tews JK, Torres N, Harper AE. Some characteristics of threonine transport across the blood-brain barrier of the rat. *Journal of Neurochemistry* 1988;51:1285–93.
- [41] Burchinsky SG, Kuznetsova SM. Brain monoamine oxidase and aging: a review. *Arch Gerontol Geriatr* 1992;14:1–15.
- [42] Markus CR. Dietary amino acids and brain serotonin function; implications for stress-related affective changes. *Neuromolecular Med* 2008;10:247–58.
- [43] Ruiz HH, Chi T, Shin AC, Lindtner C, Hsieh W, Ehrlich M, et al. Increased susceptibility to metabolic dysregulation in a mouse model of Alzheimer's disease is associated with impaired hypothalamic insulin signaling and elevated BCAA levels. *Alzheimers Dement* 2016;12:851–61.
- [44] González-Domínguez R, García-Barrera T, Vitorica J, Gómez-Ariza JL. Metabolomic investigation of systemic manifestations associated with Alzheimer's disease in the APP/PS1 transgenic mouse model. *Mol Biosyst* 2015;11:2429–40.
- [45] Tremblay C, Pilote M, Phivilay A, Emond V, Bennett, Calon F. Biochemical characterization of Abeta and tau pathologies in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007;12:377–90.
- [46] Zhu X, Perry G, Moreira PI, Aliev G, Cash AD, Hirai K, et al. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 2006;9:147–53.
- [47] Yurko-Mauro K, McCarthy D, Rom D, Nelson EB, Ryan AS, Blackwell A, et al. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement* 2010;6:456–64.

## Annexe B : Autres articles publiés

1. Vandal M, White PJ, **Tournissac M**, Tremblay C, St-Amour I, Drouin-Ouellet J, Bousquet M, Traversy MT, Planel E, Marette A, Calon F. Impaired thermoregulation and beneficial effects of thermoneutrality in the 3×Tg-AD model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 43, 47–57 (2016).

2. Traversy M-T, Vandal M, Tremblay C, **Tournissac M**, Giguère-Rancourt A, Bennett D, Calon F. Altered cerebral insulin response in transgenic mice expressing the epsilon-4 allele of the human apolipoprotein E gene. *Psychoneuroendocrinology* 77, 203–210 (2016).