

Université de Lille

Université de Lille 2 Droit et Santé

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

Simon DUJARDIN

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II

Spécialité: Neurosciences

De la cellule au primate,
propagation physiopathologique de la protéine Tau

Soutenue publiquement le 21 Septembre 2015 devant le jury composé de:

M. le Dr Michel GOEDERT	Rapporteur
M. le Pr. Lawrence RAJENDRAN	Rapporteur
Mme le Pr. Nicole DÉGLON	Examinatrice
M. le Pr. Vincent DERAMECOURT	Examineur
M. le Dr. Luc BUÉE	Président du jury
Mme le Dr. Morvane COLIN	Directrice de Thèse

A mes parents,

à mes proches,

à Marion

qui m'ont toujours soutenu
et sans qui je n'en serais pas là.

REMERCIEMENTS

I first wanted to thank Doctor **Michel Goedert**, Professor **Lawrence Rajendran**, Professor **Nicole Déglon** and Professor **Vincent Deramecourt** who make me the honour of being part of my jury and to complete this formidable adventure with me. I particularly want to acknowledge Doctors **Goedert** and **Rajendran** who kindly accepted to review this work.

Je voulais également remercier chaleureusement le docteur Frederic Saudou pour avoir accepté de faire parti de mon comité de suivi de thèse. Merci beaucoup pour votre gentillesse et vos conseils de qualité qui ont permis à cette thèse de s'améliorer.

Je tiens ensuite à exprimer ma gratitude au Docteur **Luc Buée** qui a accepté, il y a quatre ans, de considérer ma candidature au sein de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » et sans qui cette thèse ne serait pas. **Luc**, je tenais à vous remercier pour ces quatre formidables années passées à vos côtés et pendant lesquelles vous avez toujours été là pour me piloter, m'écouter, m'encourager, me recadrer. J'ai particulièrement apprécié tous les moments passés avec vous, tantôt à avoir des débats scientifiques enflammés, tantôt à avoir des fous rires. Je ne suis pas certain que j'aurai de nouveau un chef comme vous et donc une fois de plus, merci pour tout !

Si je ne devais remercier qu'une personne, ce serait sans hésiter le Docteur **Morvane Colin**. Morvane, depuis mon arrivée au laboratoire en 2011 jusqu'à l'écriture de cette thèse, vous avez toujours été, pour moi, une directrice de thèse parfaite. Vous avez su être là pour moi dès que j'en avais besoin et me laisser la liberté nécessaire pour que je m'accomplisse complètement pendant ma thèse. J'ai particulièrement apprécié que vous m'ayez toujours considéré plus comme un chercheur que comme un étudiant. Que ce soit votre ouverture d'esprit, vos inspirations scientifiques ou encore votre sens de l'humour notamment, toutes vos qualités ont permis que cette thèse soit formidable et se passe du mieux possible. Vous aurez toujours ma reconnaissance éternelle et j'espère que nos chemins de chercheurs se croiseront de nouveau dans le futur et qu'ils soient jalonnés d'autant de succès que cette thèse. Je vous souhaite ainsi plein de bonheur et de réussite pour la suite et avec vos futurs étudiants.

Je voulais également remercier nos collaborateurs avec qui j'ai passé d'excellents moments et qui m'ont permis de donner une ampleur plus importante à ma thèse. Notamment, je souhaiter remercier tous les membres de MIRCen, et des laboratoires dirigés par les Docteurs **Philippe Hantraye** et **Emmanuel Brouillet** avec un grand merci à **Romina Aron-Badin**, **Alexis Bemelmans**, **Karine Cambon**, **Marie-Claude Gaillard**, **Gwenaëlle Aurégan**, **Noëlle Dufour** et **Charlène Joséphine** sans qui les aspects primates et microdialyse ne feraient pas partis de mon projet. Merci à tous pour votre aide et votre bonne humeur qui ont adoucis ces très longues journées à MIRCen ! Je souhaiterais aussi remercier **Virginie Zimmer**, **Alexia Spoerl**, et bien sûr **Laëtitia Péricou Troquier** du laboratoire dirigé par le Professeur **Nicole Déglon** pour leur efficacité impressionnante pendant nos venues à Lausanne ! Aussi, je voudrais dire merci aux Docteurs **Luc Bousset** et **Ronald Melki** pour avoir accepté de lancer un projet d'envergure avec nous et avec qui j'ai pu avoir d'excellentes interactions scientifiques.

Il est important pour moi de remercier toutes les personnes de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » et notamment l'ensemble des chercheurs qui ont toujours été une oreille attentive à mes travaux et d'excellent conseil. Merci aux docteurs **Valérie Buée-Scherrer**, **Marie-Laure Caillet-Boudin**, **Claire-Marie Dhaenens**, **Marie Christine Galas**, **Malika Hamdane**, **Sandrine Humez**, **Susanna Schraen**, **David Blum**, **Bruno Lefebvre**, **Nicolas Sergeant** et **Bernard Sablonnière**.

Il me semble important de remercier du fond du cœur toutes mes petites fées du labo qui m'ont aidé toutes ces années et sans qui cette thèse ne serait sûrement pas. Un grand merci à **Séverine, Raphaëlle, Cédrick, et Nadège** pour m'avoir formé et aidé toutes ces années durant. Je tiens aussi à m'excuser pour toutes les heures que vous avez passé habillés comme un cosmonaute dans le L3, en mode sauna en stéréotaxie, ou avec des problèmes de dos à force de monter des coupes...! Et en plus vous avez eu le courage de me supporter, moi, mes idées farfelues, mon rire et mon humour pas toujours de bon gout toutes ces heures durant ! Je ne sais du coup pas bien comment vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi mais sachez que j'ai particulièrement apprécié votre compagnie pendant toutes ces années et que j'espère que nous garderons contact !

Un grand merci également à **Lucie Delattre, Anne Loyens, Nathalie Jouy et Meryem Tardivel** qui m'ont été d'une grande aide technique durant toute cette thèse.

Max (ma moitié, mon yang ou encore mon Garfunkel), J'aurai pu te dédicacer cette thèse tellement tu as contribué à ce qu'elle se passe bien mais j'ai eu trop peur de déclencher l'ire de nos bien-aimées !! Je suis arrivé au labo dans l'expectative et très vite tu as su, en bon voisin de bureau, m'intégrer avec ton éternelle question « what is your favorite ... ». Entre fous rires (désolé pour les personnes des bureaux à proximité), débats endiablés et karmeliets à gogo, j'espère avoir beaucoup de voisins de bureau comme toi ! J'espère que nous arriverons, un jour, à de nouveau travailler ensemble et à lancer ce projet de laboratoire commun car je n'ai pas rencontré beaucoup de gens avec autant de qualité pour la recherche que toi (bon... pour ça il faut que l'un de nous deux gagne au loto ou soit un riche héritier, mais j'ai hâte d'aller faire un petit tour au sous-sol !). En tout cas, merci d'avoir été là avec moi toutes ces années et d'être devenu un véritable ami !

Merci aussi à notre cocotte nationale, **Francisco-José Fernandez Gomez**, qui a toujours été là pour nous aider mais surtout pour partager un bon repas et une bonne karmé avec nous ! Je garde un souvenir impérissable de notre génial voyage au states (à quand l'Australie ?), de ton accent incroyable, de ton pyjama (dire piyama) mais aussi de la fermeté d'une certaine partie de ton corps dont on a abusé ! Depuis que tu es parti, la balance de précision n'est plus utilisée en hommage !

Merci beaucoup à tous les membres actuels ou anciens du laboratoire « Alzheimer & Tauopathies ». Notamment les **ITA, Sabiha, Méliza, Seb, Domi, Hélène** qui nous rendent la vie plus facile tous les jours et qui sont toujours là pour nous aider. Merci beaucoup pour votre gentillesse et je vous souhaite plein de bonheur et de réussite !

Un grand merci également à mes co-thésards, **Banban et Toto** (Ca a été un plaisir de partager le labo avec vous et je garde un excellent souvenir de notre escapade niçoise !), **Coco** (j'adore les fêtes de Noël ;-), **Vaness** (J'espère que tu t'éclates dans ton nouveau boulot !), **Claire** (Profite bien de Marius, il n'y a pas beaucoup de nounous qui ont deux thèses !) ainsi qu'aux post-docs du labo, **Roby et Lucrezia** (nos deux ritales de folie qui poussent des Ciaooooo aux airs de miaulements), **Emilie et Davina**.

Enfin, merci à toutes les autres personnes de l'équipe, actuelles ou anciennes, avec qui j'ai passé d'excellentes années, **Manon et Melissa** (l'avenir du labo), **Romain** (merci notamment pour tous tes conseils culinaires et ton aide pour relire ce manuscrit !!), **Valérie Vingdeux, Seb D., Céline, Fanny, Julien, Vincent, Espérance, Amélie, Andréa**.

Un immense merci à l'ensemble des personnes du centre de recherche Jean-Pierre Aubert qui passe leur temps à faciliter notre vie. Notamment **Céline, Sophie, Michèle, Nathalie**, ainsi que **Karim et Thomas** ! Mille merci !

Pour terminer, je tiens à remercier mes financeurs, la **région Nord-Pas-de-Calais** et **l'Inserm**.

RESUME

Tau est une protéine stabilisatrice des microtubules majoritairement exprimée au niveau neuronal qui existe en six isoformes différentes appelées isoformes 3R ou 4R en fonction de l'inclusion de 3 ou 4 séquences répétées dans leur domaine de liaison aux microtubules. Dans une vingtaine de pathologies neurodégénératives appelées tauopathies, des protéines Tau anormalement modifiées s'agrègent formant des lésions intracellulaires appelées dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Selon les tauopathies, la morphologie des lésions, leur composition en isoformes ainsi que l'évolution spatio-temporelle de la pathologie diffèrent. Dans la plupart des cas, les tauopathies sont sporadiques mais quelques mutations du gène codant Tau (MAPT) causent des formes familiales de démences fronto-temporales. Dans certaines tauopathies sporadiques comme la maladie d'Alzheimer, la DNF est initiée dans des régions spécifiques et évolue ensuite de manière stéréotypée. Ces stades neuropathologiques sont bien définis, mais les mécanismes expliquant cette évolution restent méconnus. Récemment, certaines études ont proposé que des espèces pathologiques de la protéine Tau sont capables de se déplacer activement de région en région suivant des connexions neuro-anatomiques propageant ainsi la pathologie Tau dans le cerveau.

Dans ce contexte, nous avons démontré à la fois *in vitro*, en utilisant un système de chambre microfluidique mais également *in vivo* dans un nouveau modèle de rat, que la protéine Tau est activement et physiologiquement transférée de cellule en cellule. De manière intéressante, la pathologie Tau qui se développe dans l'hippocampe des rats se propage également de région en région. Ce modèle étant basé sur une technologie de vectorisation virale, nous avons pu tester différentes constructions pour montrer qu'étonnamment, la pathologie Tau induite par des espèces mutées ou des isoformes 3R est restreinte autour du site d'initiation et ne propage pas aussi loin que pour les espèces sauvages 4R.

La protéine Tau ainsi que la DNF se propagent donc de cellules en cellules mais les mécanismes expliquant cette propagation restent inconnus. Pour aborder cette question, et connaissant l'importance des vésicules extracellulaires (EVs) dans les mécanismes de communication intercellulaire, nous avons analysé leur implication dans le transfert de la protéine Tau. Nous avons purifié des EVs *in vitro* depuis des surnageants de culture mais également *in vivo* depuis des échantillons de liquide céphalorachidien de primates ainsi que des échantillons de fluide interstitiel cérébral de rat. Nous avons ainsi démontré que la protéine Tau est sécrétée de manière physiologique sous forme libre mais également au sein de EVs issues du bourgeonnement de la membrane plasmique nommées ectosomes. Il apparaît aussi qu'en cas de surexpression ou de présence de DNF, la protéine Tau est retrouvée dans des exosomes, des EVs issues de la voie endosomes/lysosomes.

Ces résultats nous montrent que la protéine Tau se propage de neurone en neurone physiologiquement mais aussi durant des processus pathologiques. Il semble aussi exister des espèces particulières de protéine Tau plus promptes à se propager que d'autres. Ces différences pourraient en partie expliquer les différents phénotypes observés au sein des tauopathies. Nous avons aussi démontré que la protéine Tau est sécrétée via plusieurs voies de sécrétions qui pourraient refléter différents stades physiopathologiques. Des études complémentaires sont nécessaires notamment pour 1-clairement identifier les mécanismes de sortie et d'entrée de Tau dans les neurones. 2-comprendre si certaines espèces vont spécifiquement induire la pathologie dans les neurones secondaires et s'il est possible de les bloquer grâce à des thérapies ciblées. Et 3-identifier les raisons qui expliquent les vulnérabilités de certaines populations cellulaires.

ABSTRACT

Tau is a microtubule-associated protein mainly expressed in neurons. There are six different isoforms of this protein bearing either 3 or 4 microtubule-binding domains and called 3R-Tau or 4R-Tau. During the course of tauopathies, Tau proteins are abnormally and excessively modified and aggregate in specific intracellular lesions called neurofibrillary degeneration (NFD). According to tauopathies, the morphology of lesions, their isoforms' composition and the spatiotemporal evolution of the pathology are different. Moreover, tauopathies are mostly sporadic but some mutations on Tau gene (MAPT) induce rare forms of familial fronto-temporal dementia. In some sporadic tauopathies like Alzheimer's disease, the NFD is initiated in specific brain areas and evolves stereotypically in well-defined neuropathological stages. The mechanisms underlying such evolutions are mainly unknown but recently, different studies had proposed that some pathological species of Tau protein are able to actively move from region-to-region following neuro-anatomical connections and to spread the Tau pathology intra-cerebrally by this way.

Within this context, we have demonstrated either *in vitro* using a microfluidic chamber system or *in vivo* using a new rat model, that Tau proteins are actively and physiologically transferred from cell-to-cell. Interestingly, in this model we could also follow the development of the Tau pathology inside the rats' hippocampus but also its propagation from region-to-region. This model is based on a viral vector technology; therefore, we were able to test different construct and to show that surprisingly, Tau pathology induced by mutated or 3R-Tau species is restricted to the vicinity of the initiation site and do not propagate as far as the wild-type 4R-Tau species.

Tau proteins as well as NFD are cell-to-cell propagating but the mechanisms underlying this phenomenon are still unknown. In order to address this point and knowing the significance of extracellular vesicles (EVs) in the intercellular communication mechanisms, we analysed their implication in the transfer of Tau proteins. We purified EVs *in vitro* from culture supernatants but also *in vivo* from primates' cerebrospinal fluid samples and rats' cerebral interstitial fluid samples. We demonstrated that Tau proteins are secreted physiologically in a free form but also within specific EVs named ectosomes and are secreted through a budding process at the plasma membrane. Also, it seems that when Tau is overexpressed and when NFD is present, Tau proteins are retrieved within EVs named exosomes, which are derived from the endosomal pathway.

These results show that Tau proteins propagate from neuron to neuron physiologically but also during pathological processes. It seems also that some specific Tau species are more prone to propagate than others. These differences could partly contribute to the different phenotypes observed among tauopathies. We have also demonstrated that Tau proteins are secreted via several pathways of secretion that could reflect different pathophysiological stages. Some complementary studies are needed particularly to 1- clearly identify the cellular mechanisms of Tau exit and entry. 2- to understand if some Tau species will specifically induce Tau pathology in secondary neurons and if it is possible to block this phenomenon thanks to targeted therapy. And 3- to identify the reasons that explain the vulnerability of some specific cell populations to Tau pathology propagation.

SOMMAIRE / TABLE OF CONTENTS

REMERCIEMENTS	5
RESUME	8
ABSTRACT	9
SOMMAIRE / TABLE OF CONTENTS	11
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES / FIGURES AND TABLES LIST	15
TABLE DES ABREVIATIONS / TABLE OF ABBREVIATIONS	18
INTRODUCTION	20
CHAPITRE 1: Tau, du gène à la protéine	21
I. Le gène MAPT, origine de la protéine Tau.....	21
II. Structure de la protéine Tau.....	23
II.1. Structure primaire.....	23
II.2. Autres aspects structuraux.....	25
III. Chapter 1 summary : Tau, from gene to protein.....	26
CHAPITRE 2 : Les tauopathies : définition et aspects moléculaires	28
I. L'agrégation de la protéine Tau, aspects moléculaires et structuraux.....	29
II. Dérégulation des modifications post-traductionnelles.....	32
II.1. La phosphorylation.....	33
II.1.1. La phosphorylation, régulatrice de la physiologie de Tau.....	33
II.1.2. Dérégulations de phosphorylation dans les tauopathies.....	33
II.2. La troncation.....	35
III. Dérégulation des fonctions de la protéine Tau.....	37
III.1. Fonctions associées à la liaison de Tau aux microtubules ...	37
III.1.1. Fonctions physiologiques.....	37
III.1.2. Dérégulations pathologiques	38
III.2. Autres fonctions de la protéine Tau.....	39
IV. Chapter 2 summary: tauopathies, definition and molecular aspects.....	43
CHAPITRE 3 : Les tauopathies, un groupe très hétérogène	47
I. Les causes des tauopathies : tauopathies sporadiques versus tauopathies familiales.....	47
I.1. Tauopathies sporadiques.....	47
I.2. Tauopathies avec cause génétique.....	48
II. Différentes signatures en isoformes selon les tauopathies	50
II.1. Groupe 1 : toutes les isoformes de Tau s'agrègent.....	50
II.2. Groupe 2 : seuls les isoformes 4R de Tau sont retrouvés dans les lésions.....	51
II.3. Groupe 3 : seuls les isoformes 3R de Tau s'agrègent.....	51

II.4. Groupe 4 : seuls l'isoforme 0N3R est retrouvé dans les fibres.....	52
III. Des tableaux cliniques bien différents.....	53
III.1. Démences de type Alzheimer.....	53
III.2. Démences fronto-temporales / variante comportementale.....	54
III.3. Syndromes parkinsoniens atypiques.....	54
IV. Caractéristiques et évolutions neuropathologiques des tauopathies.....	56
IV.1. Neuropathologie générale.....	57
IV.2. Evolutions spatio-temporelles de certaines tauopathies.....	59
IV.2.1. Les stades de Braak dans la maladie d'Alzheimer.....	59
IV.2.1.1. Les stades « pré-tangle ».....	60
IV.2.1.2. Les stades de Braaks I à VI.....	60
IV.2.2. Evolution spatio-temporelle de la DNF dans la PSP.....	62
IV.2.3. Evolution spatio-temporelle de la démence à grains argyrophiles.....	63
V. Chapter 3 summary : tauopathies, a heterogeneous group.....	65
CHAPITRE 4 : La propagation de Tau.....	70
I. Le club des protéines de type prion.....	70
I.1. Caractéristiques du prion.....	70
I.2. Autres protéines de type prion.....	71
II. Tau une protéine de type prion ?.....	72
II.1. Transmissibilité et 'seeding' de la pathologie Tau ?	73
II.1.1. Etudes in vivo.....	73
II.1.2. Etudes in vitro.....	74
II.2. Propagation de la pathologie Tau / propagation de la protéine Tau.....	76
II.2.1. Transfert de la pathologie.....	76
II.2.2. Transfert de la protéine Tau.....	77
II.2.3. Mécanismes d'entrée et de sortie de la protéine Tau dans la cellule.....	77
II.2.4. Les espèces propagatives de Tau.....	80
II.3. Peut-on parler de souches concernant les fibres de protéines Tau ?.....	81
III. Chapter 4 summary: Tau propagation.....	84
OBJECTIFS	88
OBJECTIVES	90
RESULTATS / RESULTS	92
CHAPITRE 0 : Modélisation de plusieurs tauopathies.....	93
I- Introduction	93
II- Article 1 : Lentiviral Delivery of the Human Wild-type Tau Protein Mediates a Slow and Progressive Neurodegenerative Tau Pathology in the Rat Brain.....	95
	12

III- Résultats complémentaires.....	125
III.1. Développement et caractérisation d'un modèle de PNH de tauopathies permettant de valider de nouveaux biomarqueurs biochimiques et d'imagerie.....	125
III.1.1. Tests cognitifs.....	127
III.1.2. Imagerie.....	128
III.1.3. Biomarqueurs.....	129
III.1.4. Analyse en immunohistochimie post-mortem.....	131
III.2. Modélisation d'autres tauopathies.....	134
IV- Discussion.....	136
V- Chapter 0: modelling tauopathies - Supplementary information.....	138
CHAPITRE 1 : La propagation de la protéine Tau sauvage, mécanisme physiologique ou reflet de la pathologie	140
I. Introduction.....	140
II. Article 2 : Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies.....	142
III. Résultats complémentaires, les protéines Tau mutées sont aussi transférées dans des zones distantes.....	174
IV. Discussion.....	178
V. Chapter 1: propagation of wild-type Tau, physiological mechanism or mirror of the pathology? - Supplementary information.....	179
CHAPITRE 2 : Mécanismes de propagation de la protéine Tau, depuis les espèces moléculaires jusqu'aux vésicules extracellulaires.....	180
I. Différents isoformes de Tau, différentes évolutions pathologiques ?.....	180
I.1. Introduction.....	180
I.2. Article 3, Differential spreading of 3R and 4R Tau isoforms in the rat brain.....	181
I.3. Résultats complémentaires.....	190
I.3.1. Les protéines Tau 3R sont également transférées à longue distance.....	190
I.3.2. Les protéines Tau mutées, une conformation anormale précoce.....	190
I.4. Discussion.....	193
II. Les vésicules extracellulaires, un moyen de transport pour la protéine Tau ?.....	194
II.1. Introduction.....	194
II.2. Article 4 : Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein.....	195
III. Résultats complémentaires : sécrétion de la protéine Tau.....	218
III.1. Les vésicules extracellulaires, un moyen de transfert de la protéine Tau.....	218
III.2. Présence de vésicules extracellulaires dans les fluides biologiques simiens.....	220
III.3. Les protéines Tau sauvages et mutées, sécrétées différemment au sein des ectosomes.....	221
III.4. La protéine Tau, une protéine fusogénique ?.....	221
IV. Discussion.....	225

V. Chapter 2: Mechanisms of Tau protein propagation, from molecular species to extracellular vesicles – Supplementary results.....	226
DISCUSSION GENERALE	230
GENERAL DISCUSSION	240
REFERENCES	248
ANNEXES	273
Annexe 1 – Tau sequence.....	274
Annexe 2 – Animal models of Tauopathies.....	275
Annexe 3 – Clinical, Neuropathological, and Biochemical Characterization of the Novel Tau Mutation P332S.....	317
Annexe 4 – Principes des tests comportementaux chez le primate.....	333

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES / FIGURES AND TABLES LIST

Figure 1	Schematic presentation of MAPT gene, its the primary transcript and the six proteic isoforms expressed in the human brain	p.22
Figure 2	Tau physiological structure	p.24
Table 1	Les différentes Tauopathies	p.28
Figure 3	Tau aggregation: from neurofibrillary degeneration to fibers	p.30
Figure 4	Fibrils' structure and 'seeding'	p.32
Figure 5	Phosphorylome of Tau in the Alzheimer's disease	p.34
Figure 6	Truncatome of Tau protein	p.36
Figure 7	Functions and dysfunctions of Tau proteins	p.41
Figure 8	Mutations on MAPT gene	p.50
Figure 9	Tauopathies barcode	p.52
Figure 10	Macroscopic neuropathology in the different tauopathies	p.55
Figure 11	Microscopic neuropathology of tauopathies	p.58
Figure 12	Staging of Tau pathology in AD	p.61
Figure 13	Staging of Tau pathology in PSP	p.62
Figure 14	Staging of Tau pathology in AGD	p.64
Figure 15	Model of Tau pathology transmissibility mediated by a « seeding » mechanism in mice.	p.75
Figure 16	Different mechanisms that could explain the transfer of Tau protein from neuron-to-neuron.	p.79
Article 1 Figure 1	Lentiviral vectors (LVs) mediate Tau expression in the pyramidal neurons of the rat brain hippocampus	p.99
Article 1 Figure 2	Rapid neurodegenerative Tau pathology in CA1 pyramidal neurons of rat brains injected with lentiviral vectors encoding hTau46 ^{P301L}	p.101
Article 1 Figure 3	Slow and progressive neurodegenerative Tau pathology in CA1 pyramidal neurons of rat brains injected with lentiviral vectors encoding hTau46 ^{WT} .	p.102
Article 1 Figure 4	Quantitative analyses of Tau immunoreactivity in the hippocampus.	p.103
Article 1 Figure 5	Lack of phospho-Tau immunoreactivity in the CA1 pyramidal neurons of rat brains injected with phosphate-buffered saline (PBS) or lentiviral vectors (LVs) encoding green fluorescent protein (GFP).	p.104
Article 1 Figure 6	Spatio-temporal progression of Tau pathology	p.105
Article 1 Figure 7	From "strings of beads" to ghost tangle neurons in the hippocampal formation.	p.106
Article 1 Figure 8	Neuronal damage in lentiviral vector-injected rat brains	p.107
Article 1 Figure 9	Biochemical and ultrastructural characterization of abnormally phosphorylated Tau species in the rat brain.	p.108
Article 1 Supplementary Figure 1	Equivalent viral titers of LVs-hTau46 ^{WT} and LVs-hTau46 ^{P301L}	p.117
Article 1 Supplementary Figure 2	hTau46 ^{WT} does not drive Tau aggregation in mouse brains.	p.118
Article 1 Supplementary Figure 3	Tau is expressed at similar level in rat and mouse brains after lentiviral delivery.	p.119

Article 1 Supplementary Figure 4	The Wistar rat brain hippocampus expresses six Tau isoforms as seen in the human brain.	p.120
Figure 17	AAVs injection sites in NHP brains	p.126
Figure 18	Cognitive tests on NHP	p.127
Figure 19	MRI imaging realized on the NHP	p.129
Figure 20	Quantification and distribution of the glucose metabolism	p.130
Table 2	positive inflammatory factors in plasma and CSF of NHP	p.131
Figure 21	MC1 immunolabelling in the NHPs hippocampus	p.132
Figure 22	AT100-immunopositive NFTs in the NHPs	p.132
Figure 23	NeuN and HLA-DR immunolabelling in the NHPs hippocampus	p.133
Figure 24	Morphology of lesions observed with different Tau species	p.135
Article 2 Figure 1	Neuron-to-cell spread of WT Tau in a microfluidic device.	p.150
Article 2 Figure 2	The transfer of V5-hTau46 ^{WT} protein is correlated to brain area connected to the IS (caudal part of the CA1 layer).	p.151
Article 2 Figure 3	In vivo trans-synaptic transfer of WT Tau protein.	p.153
Article 2 Figure 4	Cell-to-cell protein transfer is specific to Tau protein	p.154
Article 2 Figure 5	Differential Tau spreading between WT and mutated Tau species.	p.155
Article 2 Figure 6	Spatiotemporal progression of the Tau pathology through neural networks	p.157
Article 2 Figure 7	Transferred Tau species are mainly in a dephosphorylated state	p.159
Article 2 Supplementary Figure 1	In-vitro functionality of V5-hTau46 ^{WT} .	p.162
Article 2 Supplementary Figure 2	LVs particles are not diffusing in the microgrooves or trafficking along the microtubules.	p.163
Article 2 Supplementary Figure 3	Mutant-Tau-associated Tau pathology progression	p.165
Article 2 Supplementary Figure 4	WT Tau-associated Tau pathology progression	p.168
Figure 25	The tag V5 has no influence on the Tau pathology development	p.175
Figure 26	Les protéines Tau-V5 sauvages et mutées sont transférées depuis le site d'injection jusqu'à des sites distants	p.176
Figure 27	Biochemical analysis of Tau proteins into the GrO.	p.177
Article 3 Figure 1	Tau species modulate Tau pathology progression	p.183
Article 3 Figure 2	Mutant and WT-Tau associated pathology progression.	p.185
Article 3 Figure 3	Tau species modulate Tau secretion in the CSF	p.186
Figure 28	The different Tau isoforms are all transferred in the GrO	p.191
Figure 29	Mutated Tau proteins are precociously misfolded	p.192
Article 4 Figure 1	Characterisation of ectomal and exosomal fractions from rat primary embryonic cortical cells.	p.200
Article 4 Figure 2	Endogenous Tau is released from rat primary embryonic cortical cells in non-exosomal vesicles: the ectosomes	p.202
Article 4 Figure 3	Characterisation of ectosomal and exosomal fractions from cell lines	p.203
Article 4 Figure 4	A small portion of Tau is shifted to the classical secretory pathway when Tau over-accumulates in cells.	p.204
Article 4 Figure 5	Tau is inside the vesicles	p.207

Article 4 Figure 6	Neurofibrillary degeneration related to WT Tau in the rat brain supports vesicular Tau secretion in ISF.	p.208
Figure 30	Tau proteins are transferred from cell-to-cell via ectosomes.	p.219
Figure 31	Tau proteins are retrieved inside extracellular vesicles purified from plasma and CSF of a NHP model of tauopathy	p.220
Figure 32	Differential secretion depending on Tau species overexpressed in the rat brain.	p.222
Figure 33	Incubation of recombinant Tau proteins with synthetic liposomes modeling the external cellular plasma membrane	p.223

TABLE DES ABREVIATIONS /

TABLE OF ABBREVIATIONS

A β	peptide beta-amyloïde
AD	Alzheimer's disease
AGD	démence à grains argyrophyles / argyrophilic grain disease
ARNm	ARN messagers
CA1	Zone 1 de la corne d'Ammon
CBA	Chicken β -actin
CBD	corticobasal degeneration
CNS	central nervous system
CSF	Cerebrospinal Fluid
DCB	dégénérescence cortico-basale
DNF	dégénérescences neurofibrillaires
DNMS	Delayed no-matching to sample
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FRET	transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
FTDP-17	démences fronto-temporales avec parkinsonisme lié au chromosome 17 / Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17
GFP	Green Fluorescent Protein
GrO	couche de cellules granulaires du bulbe olfactif / granular cells of the olfactory bulb
GUVs	Giant Unilamellar Vesicles
GWAS	genome-wide association study
IRM	imagerie à résonance magnétique
ISF	Interstitial fluid
kDa	kilodaltons
LVs	Lentiviral vectors
LCR	liquide céphalo-rachidien
MA	maladie d'Alzheimer
mGFP	protéine GFP membranaire / membraneous GFP
MPT	modifications post-traductionnelles
MRI	magnetic resonance imaging
NFD	neurofibrillary degeneration
NFT	neurofibrillary tangles
NHP	Non-human primate
PET	tomographie à émission de positon / positron emission tomography
PHF	Paired Helical Filaments
PiD	maladie de Pick / Pick's disease
PNH	Primate non-humain
PrPsc	protéine prion mal conformée
PrPc	protéines prion normales

Table des abréviations

PSP	paralyse supranucléaire progressive / Progressive Supranuclear Palsy
PTM	post-translational modifications
scAAVs	self complementary Adeno-Associated Virus
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium
SNC	système nerveux central
TSPO	translocator protein 18 kDa
VDT	Visual Discrimination Task
vg/ml	viral genome containing particles/ml
WT	wild-type

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: Tau, du gène à la protéine.

La protéine Tau a été décrite pour la première fois en 1975 comme un facteur permettant la polymérisation des microtubules (Weingarten *et al*, 1975; Mandelkow *et al*, 2007). De nombreuses études ont, depuis, permis de déterminer les origines, la structure, le comportement ainsi que certaines fonctions de cette protéine complexe.

I. Le gène MAPT, origine de la protéine Tau

La protéine Tau est encodée chez l'homme par un gène unique, le gène MAPT, localisé sur le chromosome 17 au locus 17q21 (Neve *et al*, 1986). Le gène MAPT, pour « Microtubule-Associated Protein Tau » a longtemps été considéré comme uniquement exprimé au niveau neuronal (Drubin *et al*, 1986) mais des ARN messagers (ARNm) ainsi que des protéines Tau ont été décrits dans plusieurs types de cellules non-neuronales chez les rongeurs (Gu *et al*, 1996; LoPresti *et al*, 1995; Vanier *et al*, 1998; Müller *et al*, 1997), les bovins (Ashman *et al*, 1992; Ksiezak-Reding *et al*, 2003), ainsi que chez l'homme (Ikeda *et al*, 1995; Ingelson *et al*, 1996; Sigala *et al*, 2014).

L'analyse moléculaire du gène MAPT humain a révélé la présence de 16 exons numérotés de -1 à 14 (Andreadis *et al*, 1992 ; figure 1). Dans le système nerveux central (SNC) humain, les exons 4A et 8 sont exclus du transcrit primaire. L'exon 4A est uniquement présent dans le système nerveux périphérique (Georgieff *et al*, 1993) et l'exon 8 est spécifique de la tau bovine (Chen *et al*, 1994). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs tandis que les exons 2, 3, 6 et 10 sont alternatifs selon le type cellulaire ainsi que le stade de développement (Goedert *et al*, 1989a; Andreadis, 2005). Les exons -1 et 14 sont présents dans l'ARNm mais ne sont pas traduits tandis que l'exon 6 est très faiblement exprimé donnant une isoforme minoritaire de Tau tronquée dans sa partie carboxy-terminale (Wei & Andreadis, 1998; Luo *et al*, 2004). L'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de l'exon 2 (Andreadis *et al*, 1995). Six transcrits majoritaires de Tau différents sont donc présents dans le SNC adulte : 2-3-10- ; 2+3-10- ; 2+3+10- ; 2-3-10+ ; 2+3-10+ ; 2+3+10+ (Goedert *et al*, 1989a; Andreadis, 2005 ; figure 1).

L'épissage alternatif de ces isoformes est régulé en fonction du développement. En effet, la présence des exons 2, 3 et 10 est spécifique du système nerveux adulte, l'isoforme la plus

courte (2-3-10-) étant la seule exprimée pendant l'embryogenèse (Goedert *et al*, 1989a; Couchie & Nunez, 1985; Bullmann *et al*, 2009). Quantitativement, dans le cerveau humain adulte, il semble que les formes contenant l'exon 3 soient minoritaires (moins de 10% de la totalité des transcrits) tandis qu'environ 50% des transcrits contiennent l'exon 2 et l'exon 10 (Andreadis, 2005).

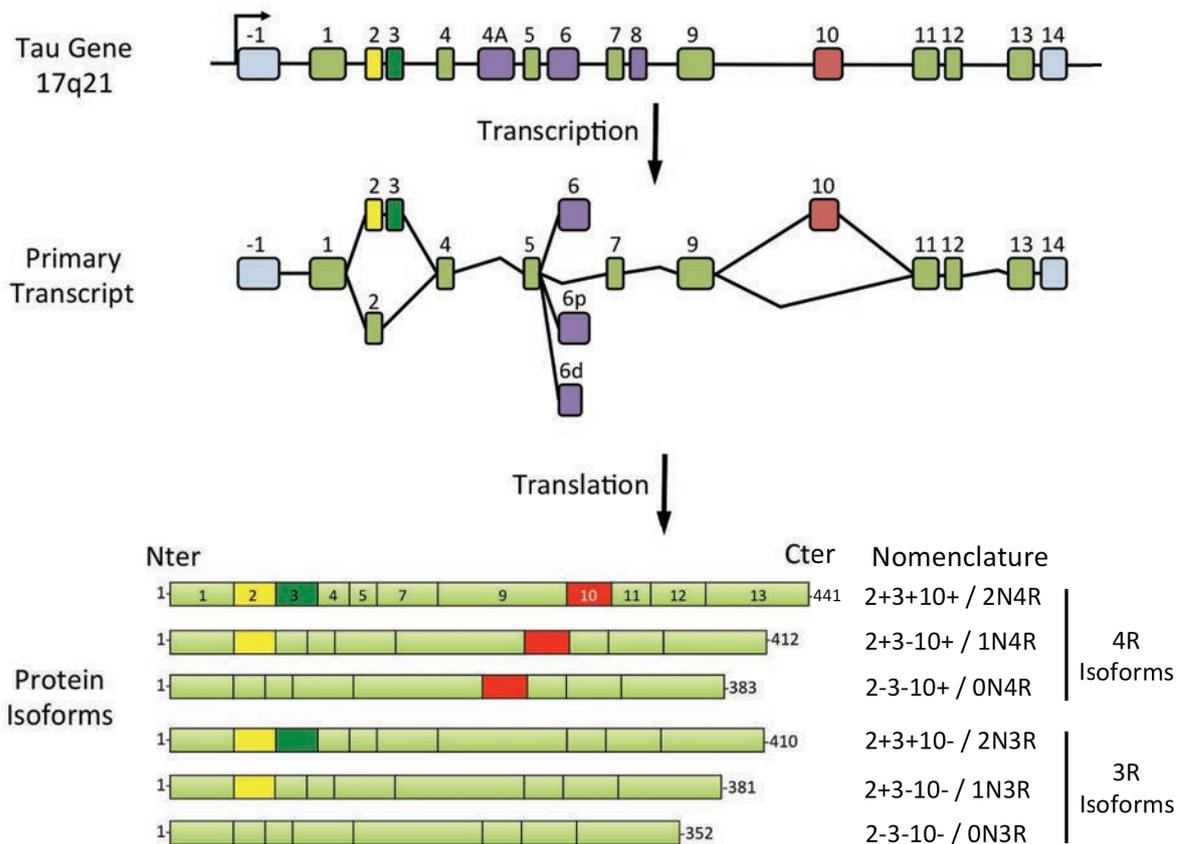


Figure 1 : Représentation schématique du gène MAPT, de son transcrit primaire et des six isoformes de la protéine Tau exprimées dans le cerveau humain adulte. Le gène MAPT humain contient 16 exons numérotés de -1 à 14. Dans le SNC humain, les exons 4A et 8 sont exclus du transcrit primaire. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs tandis que les exons 2, 3, 6 et 10 sont alternatifs, l'exon 3 n'apparaissant jamais indépendamment de l'exon 2. Les exons -1 et 14 sont présents dans l'ARNm mais ne sont pas traduits. Six transcrits majoritaires de Tau différents sont présents dans le SNC adulte : 2-3-10- ou 0N3R; 2+3-10- ou 1N3R; 2+3+10- ou 2N3R; 2-3-10+ ou 0N4R; 2+3-10+ ou 1N4R; 2+3+10+ ou 2N4R. Modifiée depuis (Buée *et al*, 2000)

Figure 1: Schematic presentation of MAPT gene, its primary transcript and the six proteic isoforms expressed in the human brain. MAPT gene is composed of 16 exons. In the central nervous system (CNS), exons 4A and 8 are excluded from the primary transcript. Exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 are constitutive whereas exons 2, 3, 6 et 10 are alternative. Exon 3 never appears independantly of exon 2. Exons -1 and 14 are present in the mRNA but are never translated. Six main transcripts are present in the adult CNS: 2-3-10- or 0N3R; 2+3-10- or 1N3R; 2+3+10- or 2N3R; 2-3-10+ or 0N4R; 2+3-10+ or 1N4R; 2+3+10+ or 2N4R. Modified from (Buée *et al*, 2000)

II. Structure de la protéine Tau

Dans le SNC humain, les six isoformes majoritaires de Tau provenant de la traduction des transcrits du gène MAPT contiennent entre 352 et 441 acides aminés et ont des masses moléculaires apparentes comprises entre 45 et 65 kilodaltons (kDa) après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (Sergeant *et al*, 2008; Buée *et al*, 2000 ; figure 1).

Très rapidement après la découverte de la protéine Tau, il a été mis en évidence que celle-ci a des propriétés biochimiques inhabituelles. En effet, elle apparaît particulièrement soluble, résistante aux traitements acides ainsi qu'aux traitements par la chaleur (Cleveland *et al*, 1977a).

II.1. Structure primaire

Au regard de la structure primaire de la protéine Tau, il apparaît de façon surprenante qu'elle contient un nombre important d'acides aminés basiques et hydrophiles et que seuls cinq acides aminés (glycine, lysine, proline, sérine, thréonine) représentent la moitié de sa séquence peptidique (Mandelkow *et al*, 2007 ; annexe 1).

Malgré cette redondance importante, quatre parties ayant des propriétés biochimiques et fonctionnelles distinctes peuvent être mises en évidence dans la séquence peptidique de Tau (figure 2A) :

- une partie amino-terminale acide,
- une partie riche en proline,
- une partie appelée « domaine de liaison aux microtubules »
- une queue carboxy-terminale.

La partie amino-terminale de la protéine Tau a une longueur de 85, 114 ou 143 acides aminés selon l'insertion ou non des domaines peptidiques codés par les exons 2 et 3 du gène MAPT. La principale caractéristique biochimique de ce domaine est qu'il est riche en acides aspartiques (15 sur l'isoforme la plus grande) et acides glutamiques (18 sur l'isoforme la plus grande) et pauvre en lysines (9 sur l'isoforme la plus grande) et arginines (3 sur l'isoforme la plus grande) ce qui lui confère un point isoélectrique de 3,8 (voir la séquence de la protéine Tau, annexe 1). Quand la séquence peptidique codée par l'exon 2 est insérée seule, ou avec

celle codée par l'exon 3, les isoformes sont appelées respectivement 1N et 2N. Au contraire, quand aucun domaine amino-terminal alternatif n'est inséré, les protéines sont appelées 0N (figure 1).

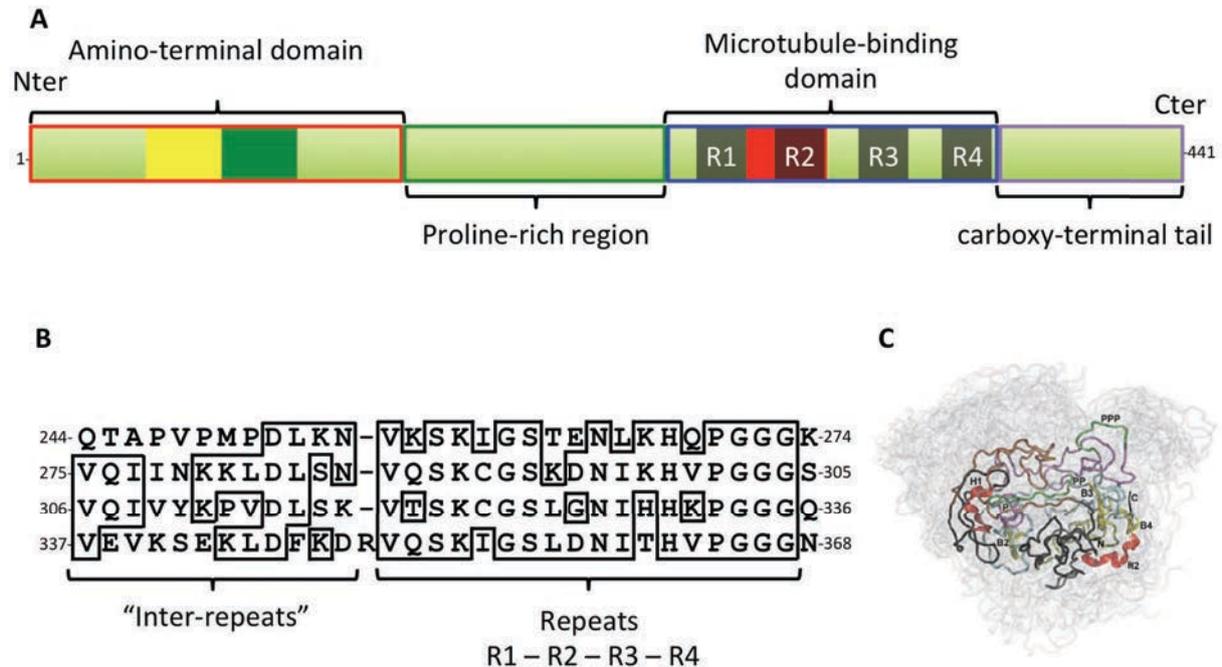


Figure 2 : Structure physiologique de Tau. A- La protéine Tau peut être séparée en quatre domaines aux propriétés biochimiques différentes : une région amino-terminale acide (correspondant à l'expression des exons 1 à 5). Une région riche en proline correspondant à l'expression des exons 7 et 9. Un domaine de liaison aux microtubules avec quatre séquences répétées (R1 à R4 représentées en noir). Et une queue carboxy-terminale (exon 13). B- séquences et alignement des domaines répétés du domaine de liaison aux microtubules (modifié de (Himmler *et al*, 1989)). C- Représentation des conformations de la protéine Tau 2N4R en solution. Les régions présentant des hélices alpha ou des feuilletts beta transitoires sont représentées en rouge et jaune respectivement. Les hélices polyproline II sont représentées en vert. En gris dans le fond : Un ensemble de 20 conformations possibles de la protéine Tau en solution. Modifié depuis (Mukrasch *et al*, 2009)

Figure 2 : Tau physiologic structure. A- 4 domains with different biochemical properties can be retrieved in Tau protein: an acidic aminoterminal part (corresponding to the expression of exons 1 to 5). A proline-rich domain (corresponding to the expression of exons 7 and 9). The microtubule-binding domain with 4 repeated sequences (R1 to R4 illustrated in black). And a carboxy-terminal tail (exon 13). B- sequences and alignments of the repeated domains of the microtubule-binding domain (modified from (Himmler *et al*, 1989)). C- Illustration of the conformations of Tau 2N4R protein in solution. The domains with transitory alpha helices or transitory beta sheets are respectively illustrated in red and yellow. In green are the polyproline II helices. The grey background corresponds to 20 possible conformations of Tau proteins in solution. Modified from (Mukrasch *et al*, 2009)

Le deuxième domaine distinct est une région riche en proline entre les acides aminés 144 et 243 qui est une région basique avec un point isoélectrique aux environs de 10. Ces deux domaines amino-terminaux sont globalement chargés négativement et constituent ensemble le « domaine de projection » de la protéine Tau. En effet, quand la protéine Tau est

liée aux microtubules, il existe une répulsion électrostatique entre ce domaine et les microtubules qui rend cette extrémité libre (Ballatore *et al*, 2007; Kar *et al*, 2003). Cette propriété servirait notamment à espacer les microtubules les uns des autres (Hirokawa *et al*, 1988; Chen *et al*, 1992).

Le domaine suivant, entre les acides aminés 244 et 368, est de nature basique et chargé positivement. Il est composé de trois ou quatre séquences répétées imparfaites de 31 ou 32 acides aminés (selon l'inclusion ou non de l'exon 10) (Goedert *et al*, 1989b; 1989a ; figure 2B). Ce domaine représente le domaine de liaison de la protéine Tau avec les microtubules (Himmler *et al*, 1989). Les séquences répétées sont hautement conservées phylogénétiquement entre espèces mais également dans les protéines associées aux microtubules (Chapin & Bulinski, 1992; Lewis *et al*, 1988). Les isoformes avec trois séquences répétées sont appelés 3R au contraire des isoformes 4R (Buée *et al*, 2000 ; figure 1).

La queue carboxy-terminale de la protéine Tau est encodée par l'exon 13. Ce domaine est biochimiquement acide avec un point isoélectrique aux environs de 6 et est riche en sites de phosphorylation (Noble *et al*, 2013).

Dans la suite de ce travail, les nomenclatures « N » et « R » seront utilisées pour décrire les six isoformes protéiques majoritaires en fonction de l'insertion ou non des domaines amino-terminaux et du nombre de séquences répétées carboxy-terminales (0N3R ; 1N3R ; 2N3R ; 0N4R ; 1N4R ; 2N4R) (figure 1).

II.2. Autres aspects structuraux

En tentant de caractériser les structures secondaire et/ou tertiaire de la protéine Tau, Cleveland et collaborateurs ont démontré très tôt que la protéine Tau est très pauvre en structures secondaires (Cleveland *et al*, 1977a). Ces résultats ont été confirmés plus tard avec une technique similaire de dichroïsme circulaire (Schweers *et al*, 1994; Goedert *et al*, 1999) mais également par diffusion des rayons X aux petits angles (Schweers *et al*, 1994; Mylonas *et al*, 2008), ou encore par spectroscopie Raman ou résonance magnétique nucléaire (Syme *et al*, 2002; Mukrasch *et al*, 2009). Ces différentes études ont démontré que la protéine Tau est une protéine nativement non conformée n'adoptant pas une structure compacte. En effet, elle contient peu de structures secondaires de type hélices alpha, hélices polyproline de type II ou encore feuillets beta qui sont transitoires et font de la protéine globale une protéine flexible intrinsèquement non ordonnée.

Ces études ainsi que des observations de la protéine Tau en microscopie électronique (Schweers *et al*, 1994; Hirokawa *et al*, 1988), ont longtemps suggéré que la protéine Tau adopte une conformation linéaire en solution. Cependant, les travaux de Jeganathan et collaborateurs, ont montré par une technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) l'existence d'interactions intramoléculaires au sein de la protéine Tau en solution. La protéine Tau serait conformée en « trombone » avec notamment des interactions entre la partie amino-terminale et la partie carboxy-terminale (Jeganathan *et al*, 2006). Ces résultats ont été affinés par une étude en spectroscopie RMN montrant de nombreuses interactions intramoléculaires transitoires au sein de la protéine Tau avec notamment des interactions entre les domaines répétés et les parties amino- et carboxy-terminales ainsi que des interactions entre les domaines répétés et la région riche en proline (Mukrasch *et al*, 2009 ; figure 2C). L'ensemble de ces études montre que la protéine Tau a une structure flexible et dynamique qui lui permet de revêtir des conformations diverses au grès des interactions transitoires entre ses acides aminés. Cette structuration extrêmement variable est aussi régulée par les modifications post-traductionnelles (MPT) ainsi que par des interactions avec des partenaires protéiques tels que les microtubules.

En conclusion, la protéine Tau existe sous six isoformes différentes dont la composition en acides aminés rend leurs structurations globales atypiques et pauvres en structures secondaires. Dans certaines pathologies neurodégénératives appelées tauopathies, la protéine Tau est particulièrement dérégulée au niveau structurel mais également au niveau fonctionnel ce qui entraîne son agrégation dans les neurones et la mort cellulaire.

III. Chapter 1 summary : Tau, from gene to protein

Tau protein is a microtubule-associated protein encoded by a single gene located on chromosome 17: MAPT. Even if the presence of Tau has been described in several non-neuronal cells, MAPT gene is mostly expressed in neurons (for review: (Buée *et al*, 2000). MAPT gene is composed of 16 exons (figure 1). In the CNS, exon 4A and 8 are automatically excluded and exon 6 is weakly expressed as a minor isoform (Georgieff *et al*, 1993). Exons 2, 3, and 10 are alternatively spliced depending on the cell types and the development stages (Goedert *et al*, 1989a; Andreadis, 2005). Exon 3 never appears independently of exon 2 allowing for the existence of six main isoforms in the adult human CNS: 2-3-10- (or 0N3R);

2+3-10- (or 1N3R); 2+3+10- (or 2N3R); 2-3-10+ (or 0N4R); 2+3-10+ (or 1N4R); 2+3+10+ (or 2N4R) (Goedert *et al*, 1989a; Andreadis, 2005 ; figure 1).

In the primary structure of Tau protein, four parts with specific functional and biochemical properties can be highlighted: an acidic amino-terminal part (isoelectric point = 3.8), a basic proline-rich region (isoelectric point = 10), a microtubule-binding region and a carboxy-terminal tail rich in phosphorylation sites (isoelectric point = 6 ; annexe1, figure 2A). The basic and positively charged microtubule-binding region is composed of 3 or 4 imperfect repeated sequences (depending on the inclusion or not of exon 10) that are phylogenetically conserved between species and between microtubule-associated proteins (Goedert *et al*, 1989b; 1989a; Himmler *et al*, 1989; Chapin & Bulinski, 1992; Lewis *et al*, 1988 ; figure 2B). Due to its composition in amino acids, Tau protein has unusual biochemical properties: highly soluble, resistant to acid treatment and thermostable (Cleveland *et al*, 1977a). Moreover, Tau protein is a flexible, natively unfolded and intrinsically disordered protein because of a low amount of secondary/tertiary structures (Cleveland *et al*, 1977a; Schweers *et al*, 1994; Goedert *et al*, 1999; Mylonas *et al*, 2008; Syme *et al*, 2002; Mukrasch *et al*, 2009). However, the protein does not seem to be linear in solution as initially described (Schweers *et al*, 1994; Hirokawa *et al*, 1988). Tau is indeed a very dynamic protein with several transitory intramolecular interactions particularly between the repeated domains and the amino-, carboxy-terminal parts as well as the proline-rich region (Jeganathan *et al*, 2006; Mukrasch *et al*, 2009 ; figure 2C). This structure is most likely regulated by post-translational modifications (PTM) as well as by interactions with protein partners such as microtubules.

Chapitre 2 : Les tauopathies :

définition et aspects moléculaires

En 1906, Alois Alzheimer décrit pour la première fois morphologiquement des enchevêtrements fibrillaires intra-neuronaux dans le cerveau d'une patiente atteinte de démence présénile appelée par la suite maladie d'Alzheimer (MA) (Alzheimer, 1907; Stelzmann *et al*, 1995). Il faudra attendre le milieu des années 80 pour que plusieurs groupes indépendants identifient la protéine Tau comme le principal composant de ces lésions intra-neuronales appelées dégénérescences neurofibrillaires (DNF) ou pathologie Tau (Brion *et al*, 1985; Grundke-Iqbal *et al*, 1986b; 1986a; Ihara *et al*, 1986; Wood *et al*, 1986; Delacourte & Defossez, 1986; Goedert *et al*, 1988; Lee *et al*, 1991).

Table 1 - Les différentes Tauopathies

Maladie d'Alzheimer
Démence à grains argyrophiles
Dégénérescence Corticobasale
Maladie de Pick
Paralyse supra-nucléaire progressive
Démence frontotemporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17
Tauopathie primaire lié au vieillissement
Dégénérescence lobaire fronto-temporale
Encéphalopathie traumatique chronique
Trisomie 21 / Syndrome de Down
Dystrophie myotonique
Sclérose latérale amyotrophique / Complexe démence-parkinsonisme de l'île de Guam
Démence parkinsonienne
Parkinsonisme de Guadeloupe
Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker / Maladie à Prion avec accumulations neurofibrillaires
Neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer
Maladie de Niemann-Pick de type C
Maladie du motoneurone avec dégénérescences neurofibrillaires non-Guam
Dégénérescences neurofibrillaires diffuses avec calcification
Syndrome Parkinsonien post-encéphalitique
Angiopathie amyloïde cérébrale à protéine Prion
Angiopathie amyloïde de type britannique
Démence familiale de type danois
Retard mental associé à SLC9A6
Panencéphalite sclérosante subaigüe
Tauopathie de la substance blanche avec inclusions gliales globulaires

La DNF n'est cependant pas une caractéristique spécifique de la MA depuis que la présence d'inclusions intracellulaires de protéines Tau agrégées sous forme de fibres a été identifiée dans une vingtaine d'autres pathologies neurodégénératives appelées tauopathies (table 1, pour revue : Spillantini & Goedert, 2013). Dans ces pathologies, l'agrégation intracellulaire de cette protéine est associée à des changements anormaux sur la protéine Tau comme des modifications de son épissage, de sa conformation, de ses MPT, de sa localisation dans la cellule ainsi que de ses fonctionnalités.

I. L'agrégation de la protéine Tau, aspects moléculaires et structuraux

Depuis la description de la DNF par Alois Alzheimer, de nombreux travaux ont été menés pour déterminer la structure ainsi que la nature moléculaire des lésions. Les premières expériences menées en microscopie optique ont montré des fibres envahissant la quasi-totalité du cytoplasme de la cellule (figure 3). De manière intéressante il a très vite été décrit que ces fibres sont visibles après imprégnation argentique ainsi qu'après marquage au rouge congo ou à la thioflavine mettant en évidence des structures en feuillets beta plissés (Kidd, 1963; Gallyas, 1971; Braak *et al*, 1986; Guntern *et al*, 1992). En parallèle, des études de microscopie électronique ont permis de visualiser l'ultrastructure de ces fibres et de déterminer que globalement dans la MA, les fibres sont le plus souvent des filaments appariés en hélices parallèles (PHF pour Paired Helical Filaments en Anglais) (Kidd, 1963). Dans certains cas, des filaments droits sont retrouvés en complément (Crowther, 1991; DeTure *et al*, 2002b ; figure 3). Ces deux types de structures sont également retrouvées dans d'autres tauopathies avec d'autres types de filaments comme des filaments droits larges, ou des tubules torsadés (Bugiani *et al*, 1979). Il semble que ces différents phénotypes s'expliquent par des différences de charges de certains résidus du domaine de liaison aux microtubules de la protéine Tau (DeTure *et al*, 2002b).

Après avoir déterminé que la protéine Tau est le principal composant de ces fibres (Brion *et al*, 1985; Grundke-Iqbal *et al*, 1986b), certaines études se sont intéressées à la structure moléculaire de ces fibres notamment pour comprendre pourquoi et comment, une protéine extrêmement soluble et non ordonnée comme Tau est capable de former des structures fibrillaires très ordonnées telles que les PHF.

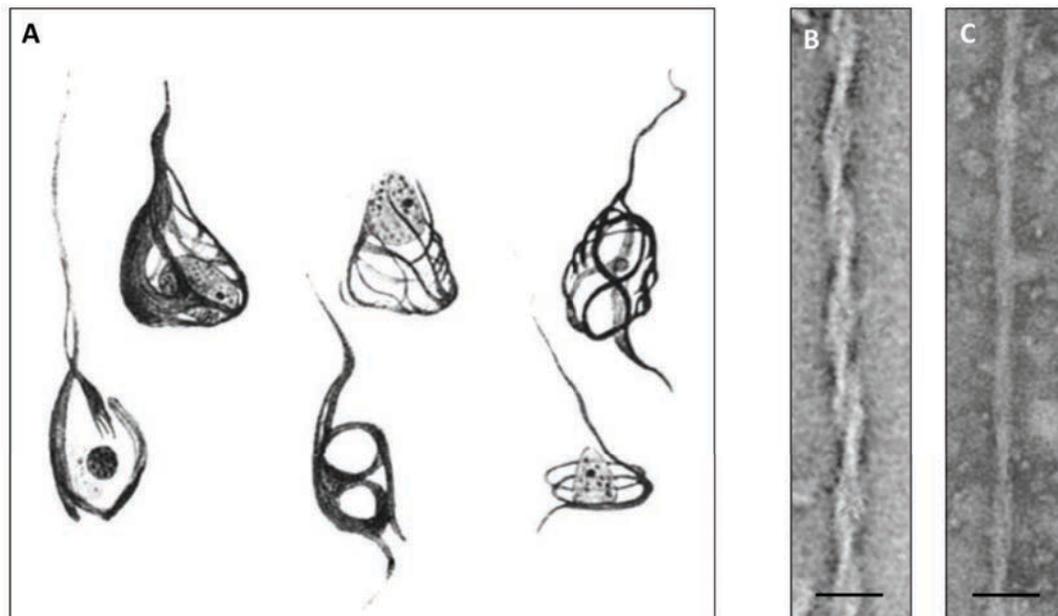


Figure 3 : L'agrégation de Tau : de la dégénérescence neurofibrillaire aux fibres. A- Dessins originaux de dégénérescence neurofibrillaire par Alois Alzheimer. D'après (Jellinger, 2006) B- PHF vu en microscopie électronique (D'après (Mandelkow *et al*, 2007)). C- Filament droit observé en microscopie électronique (d'après (Crowther, 1991))

Figure 3: Tau aggregation: from neurofibrillary degeneration to fibers. A- Original drawings of neurofibrillary degeneration by Alois Alzheimer. From (Jellinger, 2006). B- PHF observed in electronic microscopy (from (Mandelkow *et al*, 2007)). C- Straight filaments observed in electronic microscopy (from (Crowther, 1991)).

Dans un premier temps, certaines études se sont intéressées à la présence de partenaires potentiels à l'origine de l'agrégation de la protéine Tau. Pour se faire, les auteurs ont utilisé des traitements à la pronase pour séparer les protéines à l'extérieur des PHF du cœur des fibres (PHF core en Anglais). L'analyse a mis en évidence que le cœur des fibres est composé de protéines Tau mais seulement d'une séquence particulière du domaine de liaison aux microtubules montrant pour la première fois le rôle clef de ce domaine dans l'agrégation de Tau (Wischik *et al*, 1988b; 1988a; Goedert *et al*, 1988). En effet, certaines études ont, par la suite, analysé la séquence en acides aminés de Tau et ont mis en évidence dans le domaine de liaison aux microtubules deux hexapeptides localisés dans les seconde et troisième séquences répétées: $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ et $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$. Ces peptides interviennent dans le processus d'auto-agrégation des protéines Tau notamment en favorisant la formation de structures β locales (Bergen *et al*, 2000; 2001; Mukrasch *et al*, 2005). Ces résultats ont été confirmés par différentes méthodes biochimiques montrant un réel changement de structuration secondaire des protéines Tau qui ont une proportion significative de structures β quand elles sont fibrillaires alors qu'en solution, ce nombre est négligeable (Berriman *et al*, 2003; Barghorn *et al*, 2004; Inouye *et al*, 2006). Certains auteurs ont alors proposé un modèle

de fibres avec un cœur constitué du domaine de liaison aux microtubules arrangé en feuillets β parallèles, les parties amino- et carboxy- terminales des protéines restant désordonnées en périphérie ce qui est visualisé par un manteau flou en microscopie électronique (figure 4, Sillen *et al*, 2005). Au vu de la difficulté d'effectuer des études structurales complètes sur la protéine Tau ce modèle n'a pas été à ce jour confirmé de manière conclusive.

Il semble donc exister un changement de conformation secondaire dans la protéine Tau quand elle s'agrège. Le développement d'outils immunologiques permettant l'étude de la protéine Tau et des PHF comme les anticorps TG-3, MC-1 ou Alz-50 nous a montré qu'un changement de la conformation globale de la protéine intervient avec la pathologie (Jicha *et al*, 1997b; 1997a). En effet, les anticorps MC-1 et Alz-50 reconnaissent un épitope résultant de l'interaction de la partie N-terminale de Tau avec le domaine de liaison avec les microtubules (Résidus 5-9 et 313-322 de la protéine Tau) (Jicha *et al*, 1997a). Ces anticorps sont spécifiques de la pathologie Tau ce qui suggère que cette interaction est stable et confirme qu'un changement conformationnel a lieu au sein de la protéine Tau. Mukrasch et collaborateurs ont de plus montré que l'interaction de la partie amino-terminale et du domaine de liaison aux microtubules en solution est rare et très dynamique (Mukrasch *et al*, 2009). Il est difficile à ce jour de savoir si ce changement conformationnel intervient avant le processus d'agrégation ou s'il en est une conséquence même si certains résultats récents suggèrent que l'épitope MC1 apparaît après les premières étapes d'agrégation (Holmes *et al*, 2014).

Il apparaît donc à la vue de l'ensemble de ces résultats que la protéine Tau peut être considérée comme une protéine amyloïde même si cette notion est régulièrement sujette à débat. En effet, dans sa forme agrégée, elle forme des fibres insolubles visibles en microscopie électronique, ces agrégats sont de plus congophiles et possèdent une conformation en feuillets β plissés ce qui est la caractéristique des amyloïdes (Mandelkow *et al*, 2007; Liberski, 2014).

Les mécanismes expliquant ces changements structuraux majeurs sont particulièrement méconnus mais il apparaît que la protéine Tau subit des modifications post-traductionnelles anormales lors des tauopathies.

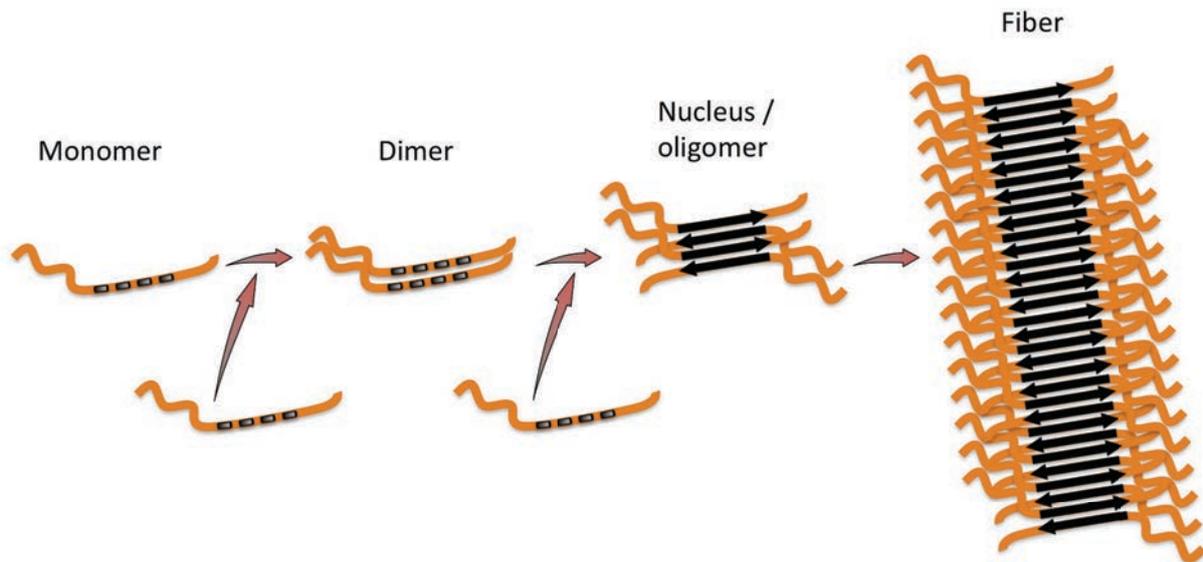


Figure 4 : structure fibrillaire et 'seeding'. Modèle de structures des fibres constituées de protéines Tau agrégée avec un cœur constitué des domaines de liaison aux microtubules arrangés en feuillettes β parallèles. Les parties amino- et carboxy- terminales des protéines restent désordonnées en périphérie. Le mécanisme d'agrégation dit de 'seeding' est représenté ici. Les monomères pour une raison inconnue forment des oligomères solubles composés de protéines Tau malconformées. Ces oligomères aussi appelés 'noyaux' sont capables de recruter des protéines monomériques et d'allonger la fibre. D'après (Jucker & Walker, 2013)

Figure 4: Fibrils structure and 'seeding'. Structural model of fibers constituted by aggregated Tau proteins with a core constituted with the microtubule-binding domains arranged in antiparallel beta-sheets. Amino- and carboxy-terminal parts remain disordered on the periphery. The mechanism of 'seeding' aggregation is illustrated here. Monomers, for an unknown reason are forming soluble oligomers composed of misfolded Tau proteins. These oligomers also called 'nucleus' are able to recruit monomeric proteins elongating the fiber. From (Jucker & Walker, 2013)

II. Dérégulation des modifications post-traductionnelles.

De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été décrites sur la protéine Tau dont la phosphorylation, l'acétylation, la troncation, la méthylation, l'isomérisation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, la nitration, la glycation, ainsi que la *O*-N-acétylglucosaminylation (Pour revue : (Chen *et al*, 2004; Sergeant *et al*, 2008)). Certaines de ces MPT comme la phosphorylation, la nitration ou la glycosylation sont de véritables régulateurs physiologiques de la protéine Tau alors que d'autres comme la polyamination, la glycation, ou encore la troncation ont été décrites uniquement dans des conditions pathologiques. A défaut d'être exhaustif, nous nous concentrerons ici sur la phosphorylation qui en plus de réguler la physiologie de Tau est un facteur essentiel des processus pathologiques et sur la troncation de Tau qui semble avoir un rôle dans la propagation de la protéine Tau.

II.1. La phosphorylation

II.1.1. La phosphorylation, régulatrice de la physiologie de Tau

Très peu de temps après la description de la protéine Tau, il a été déterminé que celle-ci pouvait être phosphorylée (Cleveland *et al*, 1977a), mais ce n'est qu'une décennie plus tard qu'il a été décrit que les sérines, thréonines et tyrosines représentaient environ 20% de la protéine soit 67 à 85 sites potentiels de phosphorylation (Butler & Shelanski, 1986). Il est maintenant très bien décrit que la phosphorylation de la protéine Tau régule son fonctionnement de manière extrêmement dynamique (Pour revue : (Noble *et al*, 2013; Sergeant *et al*, 2008)). Premièrement, la phosphorylation contrôle la liaison de Tau aux microtubules. Il a ainsi été montré dans plusieurs études que la phosphorylation de certains résidus diminue voire abolit cette liaison (Drewes *et al*, 1997; Biernat *et al*, 1993; Sengupta *et al*, 1998; Schneider *et al*, 1999). La phosphorylation contrôle dès lors plusieurs fonctions physiologiques de Tau comme la régulation de la dynamique microtubulaire (Lindwall & Cole, 1984; Cho & Johnson, 2004; Sibille *et al*, 2012) ou le transport axonal (Spittaels *et al*, 2000; Mudher *et al*, 2004) mais également sa localisation dans la cellule (Maas *et al*, 2000; Pooler *et al*, 2012).

II.1.2. Dérégulations de phosphorylation dans les tauopathies

Assez rapidement décrites chez les patients, l'hyperphosphorylation (augmentation du nombre de sites phosphorylés par protéine) et la phosphorylation anormale (phosphorylation sur un site spécifique à la pathologie) de Tau sont des caractéristiques communes à toutes les tauopathies (Baner *et al*, 1989). En effet, l'électrophorèse deux dimensions révèle que les protéines Tau extraites depuis des cerveaux de patients sont beaucoup plus phosphorylées que celles de témoins (Sergeant *et al*, 1995). Ainsi, environ 45 sites de phosphorylation peuvent être détectés sur les protéines Tau extraites depuis des agrégats alors qu'ils sont dix pour les protéines Tau purifiées depuis un cerveau normal (Hanger *et al*, 2007)(Pour revue : (Noble *et al*, 2013)). Ces sites de phosphorylation sont principalement localisés dans la partie aminotermine et dans la partie riche en proline de la protéine (figure 5). De plus, certains auteurs suggèrent que la protéine Tau soluble a 2 à 3 moles de phosphates par mole de protéine, alors que pour les protéines Tau agrégées, cette stœchiométrie est au moins trois fois plus

importante (Ksiezak-Reding *et al*, 1992).

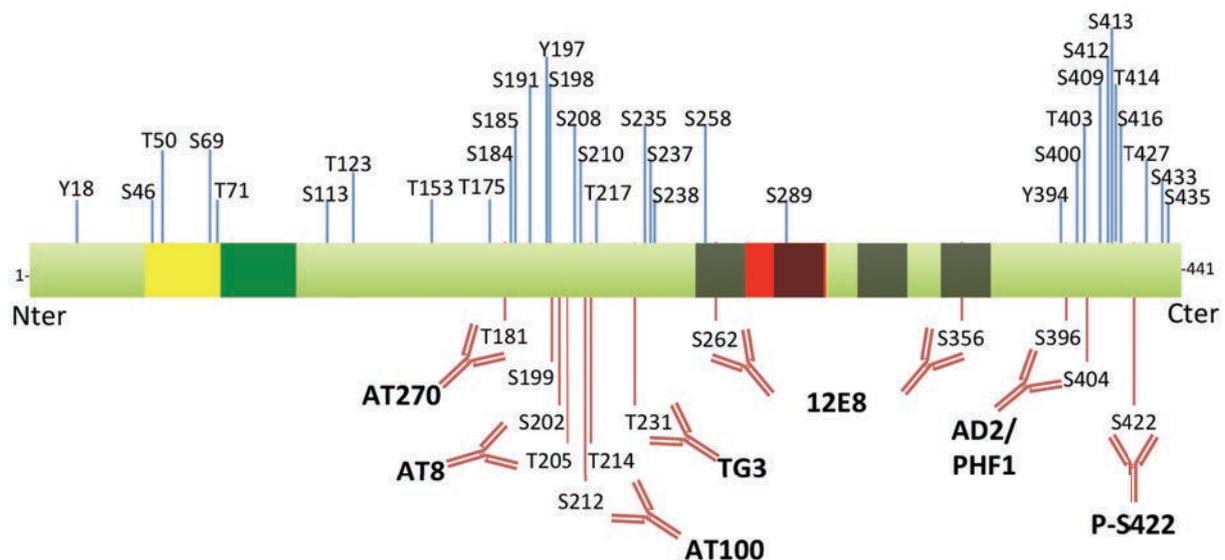


Figure 5 : Le phosphorylome de Tau dans la maladie d'Alzheimer. Représentation des 45 sites de phosphorylation identifiés sur la protéine Tau. Les principaux anticorps ciblant des épitopes d'hyperphosphorylation et de phosphorylation anormale sont représentés avec leur site associé. Modifiée depuis (Noble *et al*, 2013)

Figure 5: Phosphorylome of Tau in Alzheimer's disease. Representation of the 45 identified phosphorylation sites on Tau protein. The main antibodies targeting hyperphosphorylation and abnormal phosphorylation epitopes are illustrated. Modified from (Noble *et al*, 2013)

La découverte de ces différents sites de phosphorylation a permis de développer des outils immunologiques pour l'étude de la protéine Tau et de la DNF. Certains anticorps anti-Tau reconnaissent des phosphorylations physiologiques présentes de manière excessive dans un contexte pathologique comme l'épitope AT8 (Mercken *et al*, 1992; Porzig *et al*, 2007). D'autres sites de phosphorylation sont spécifiques de la pathologie (e.g. anti-phospho sérine 422, (Bussière *et al*, 1999)) alors que certains anticorps comme l'anticorps AT100 reconnaissent des épitopes phosphorylés et sont dépendants d'une conformation agrégée (insolubles en sarkosyl) (Allen *et al*, 2002 ; figure 5). Il paraît intéressant de noter que l'apparition des différents épitopes de phosphorylation semble corrélée à la formation de la DNF (Augustinack *et al*, 2002).

Certaines études se sont donc intéressées au rôle de la phosphorylation de Tau dans la pathologie et ont montré premièrement que l'inactivation de certaines kinases entraîne une réduction du nombre de neurones en DNF (Muñoz-Montañó *et al*, 1997; Engel *et al*, 2006; Caccamo *et al*, 2007). A l'inverse, la surexpression de certaines kinases conduit à une hyperphosphorylation de la protéine Tau et à la formation de DNF (Cruz *et al*, 2003; Xu *et al*, 2010). Enfin, plusieurs auteurs montrent des modèles de pseudo-phosphorylation de Tau

conduisant à la formation de DNF (Steinhilb *et al*, 2007b; 2007a). Tous ces résultats suggèrent que la dérégulation de la phosphorylation de la protéine Tau joue un rôle déterminant dans la pathologie.

II.2.La troncation

La troncation est une protéolyse partielle menant à la formation de fragments protéiques. Cette MPT a d'abord été observée chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer après électrophorèse d'échantillons cérébraux mais également dans des échantillons de liquide céphalo-rachidien (LCR) (Wischik *et al*, 1988b; Johnson *et al*, 1997). Il est intéressant de noter qu'à ce jour, cette MPT a été identifiée uniquement dans des cas de tauopathies et pourrait être spécifique de la pathologie même si certaines études récentes ont relancé ce débat (Garg *et al*, 2011; Derisbourg *et al*, 2015). Plusieurs groupes de recherche ont essayé de déterminer les sites de clivage de la protéine Tau notamment pour comprendre les mécanismes de protéolyse ainsi que pour essayer d'identifier des biomarqueurs de pathologie.

Deux sites majeurs de clivage carboxy-terminaux ont ainsi été découverts chez des patients atteints de maladies d'Alzheimer et largement caractérisés par plusieurs équipes indépendantes: les fragments se terminant par les résidus Glu391 et Asp421 (Novak *et al*, 1993; Gamblin *et al*, 2003; Rissman *et al*, 2004). D'autres groupes dont le nôtre ont mis en évidence plusieurs sites de clivages carboxy-terminaux ainsi qu'amino-terminaux dans la maladie d'Alzheimer répertoriés dans la figure 6 (Rohn *et al*, 2002; Guo *et al*, 2004; Watanabe *et al*, 2004; Garg *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2014; Derisbourg *et al*, 2015). De manière particulièrement intéressante, deux autres fragments ont été identifiés à partir d'échantillons d'autres tauopathies que la maladie d'Alzheimer : les fragments Thr169 et Glu187 semblent ainsi spécifiques respectivement de la dégénérescence corticobasale (DCB) et de la paralysie supranucléaire progressive (PSP) (Arai *et al*, 2004). En outre, selon les tauopathies, le profil des fragments purifiés à partir de LCR est différent (Borroni *et al*, 2008; 2009; Wagshal *et al*, 2015). Ces résultats suggèrent que les fragments de Tau pourraient jouer un rôle dans la pathologie Tau et pourraient constituer des outils diagnostiques majeurs.

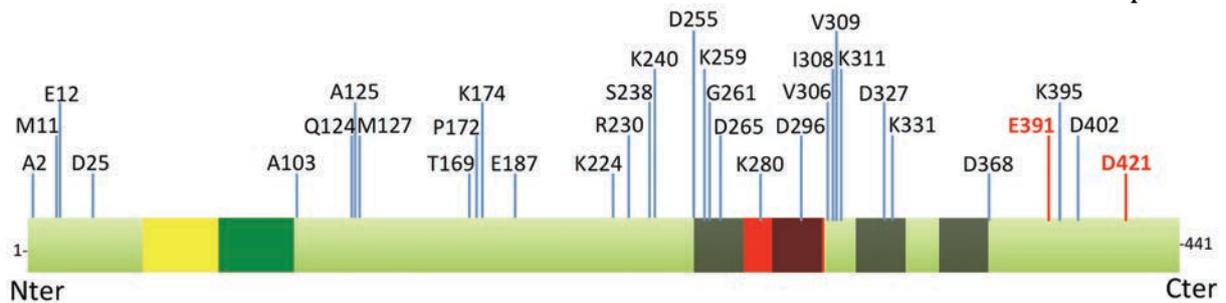


Figure 6 : Le troncatome de Tau. Représentation des 33 sites de clivages identifiés sur la protéine Tau. Les deux sites carboxy terminaux majeurs (E391 et D421) identifiés et caractérisés dans la maladie d’Alzheimer sont indiqués en rouges. Modifiée depuis (Derisbourg *et al*, 2015) et manuscrit de thèse de Maxime Derisbourg.

Figure 6: Troncatome of Tau protein. Representation of the 33 truncation sites identified on Tau protein. The main carboxy-terminal sites (E391 et D421) identified and characterized in Alzheimer’s disease (AD) are indicated in red. Modified from (Derisbourg *et al*, 2015) and from Maxime Derisbourg’s thesis manuscript

Le rôle de la troncation dans la DNF n’est pas encore clairement établi. La question notamment de savoir si la troncation de la protéine Tau est un événement précoce et antérieur aux processus de changements de conformation et d’agrégation de la protéine Tau reste largement débattue dans plusieurs études contradictoires (Guillozet-Bongaarts *et al*, 2005; Rissman *et al*, 2004). Malgré tout, plusieurs études semblent entériner que la troncation de la protéine Tau lui permet d’acquérir des propriétés de fibrillogénèse plus rapides et de catalyser l’agrégation de la protéine Tau entière (Abraha *et al*, 2000; Bergen *et al*, 2001; Frost *et al*, 2009a). Plusieurs modèles *in vivo* ont ensuite démontré que la surexpression d’une protéine Tau tronquée suffit à entraîner l’apparition d’hyperphosphorylation et de phosphorylation anormale de la protéine Tau ainsi que de DNF (Zilka *et al*, 2006; Hrnkova *et al*, 2007; de Calignon *et al*, 2010; McMillan *et al*, 2011). Certaines études en cultures cellulaires ou primaires suggèrent également que la troncation de Tau serait impliquée dans des processus d’apoptose ainsi que de fragmentation de l’ADN (Chung *et al*, 2001; Fasulo *et al*, 2000). Enfin, de manière cohérente avec ce qui est retrouvée dans le LCR, les protéines Tau extracellulaires sont souvent tronquées en amino comme en carboxy terminal (Johnson *et al*, 1997; Meredith *et al*, 2013; Amadoro *et al*, 2014; Saman *et al*, 2012; Plouffe *et al*, 2012). A ce jour, il est difficile de savoir si les fragments extracellulaires résultent d’un clivage intra ou extracellulaire ainsi que s’ils sont responsables d’une fonction particulière.

Les tauopathies semblent donc être régulées par un ensemble de dysfonctionnements moléculaires impliquant notamment des dérégulations de MPT comme la troncation et la phosphorylation. Ces mécanismes sont corrélés avec l’apparition des changements

conformationnels, de l'oligomérisation et enfin de l'agrégation intracytoplasmique des protéines Tau. Tous ces processus ont un impact important sur la physiologie de la cellule et particulièrement sur les fonctions de la protéine Tau.

III. Dérégulation des fonctions de la protéine Tau

La capacité de la protéine Tau à se lier aux microtubules lui confère des fonctions importantes dans la cellule depuis son développement jusqu'à l'homéostasie intracellulaire. Durant les processus moléculaires pathologiques, les protéines Tau ne sont plus capables de se lier aux microtubules ce qui entraîne une perte de fonction physiologique, une localisation cellulaire anarchique ainsi que des dérégulations cellulaires importantes.

III.1. Fonctions associées à la liaison de Tau aux microtubules

III.1.1. Fonctions physiologiques (figure 7)

La protéine Tau a initialement été décrite comme un facteur favorisant la polymérisation des microtubules (Weingarten *et al*, 1975; Cleveland *et al*, 1977b). Ce n'est qu'une décennie plus tard qu'il a été montré que la protéine Tau interagit directement avec les microtubules et les stabilise grâce à la présence des 3 ou 4 motifs répétés décrits dans la figure 2 (Drubin & Kirschner, 1986; Himmler *et al*, 1989; Ennulat *et al*, 1989) ainsi que d'une partie du domaine riche en proline (Goode *et al*, 1997). Le nombre de séquences répétées est important car la présence du domaine répété alternatif dans les isoformes 4R augmente l'affinité de Tau pour les microtubules mais aussi leurs vitesses de polymérisation et leurs stabilisations (Butner & Kirschner, 1991; Goedert & Jakes, 1990). La liaison de Tau avec les microtubules est régulée par la phosphorylation et a des conséquences fonctionnelles importantes.

Ainsi, la protéine Tau, par sa liaison avec les microtubules, intervient dans le bon développement du neurone et notamment dans la croissance neuritique. Il a en effet été montré *in vitro* et *in vivo* que des cellules invalidées pour la protéine Tau présentent des prolongements neuritiques plus petits ainsi qu'une croissance axonale perturbée (Caceres & Kosik, 1990; Caceres *et al*, 1991; Dawson *et al*, 2001). L'impact de Tau sur la croissance neuritique pourrait aussi être modulé par la partie amino-terminale de Tau. En effet, quand la partie amino-terminale de Tau est surexprimée dans des cultures cellulaires, la croissance

neuritique est significativement inhibée (Brandt *et al*, 1995).

Par sa liaison avec les microtubules, la protéine Tau participe aussi au maintien de la polarité neuronale avec un pôle somato-dendritique et un pôle axonal. Les protéines Tau sont d'ailleurs très peu présentes physiologiquement dans les dendrites et le soma mais sont retrouvées de manière quasi-exclusive dans l'axone (Binder *et al*, 1985; Dotti *et al*, 1987). Cette localisation de Tau est dépendante de la liaison de Tau avec les microtubules (Li *et al*, 2011).

Une des fonctions les plus importantes du réseau microtubulaire dans le neurone est le transport axonal via la dynéine et la kinésine. Il a été montré que la protéine Tau agit particulièrement sur la kinésine en réduisant sa vitesse de déplacement ainsi que sa liaison aux microtubules (Vershinin *et al*, 2007; Seitz *et al*, 2002; Dixit *et al*, 2008). Une étude suggère aussi que la protéine Tau serait capable d'inverser la direction de déplacement de la dynéine favorisant ainsi le transport rétrograde (Dixit *et al*, 2008). Ces données suggèrent donc que la protéine Tau régule physiologiquement et de manière indirecte le transport axonal.

Physiologiquement, la protéine Tau a donc des fonctions majeures pour l'homéostasie du neurone. Ces fonctions sont perturbées lors de la mise en place de la DNF.

III.1.2. Dérégulations pathologiques

Durant les processus pathologiques menant aux tauopathies, l'hyperphosphorylation ainsi que l'agrégation de la protéine Tau conduisent à un détachement de celle-ci des microtubules et à la déstabilisation du réseau microtubulaire (Alonso *et al*, 1997). Cette déstabilisation est accompagnée d'une relocalisation de la protéine Tau dans le compartiment somato-dendritique (Götz *et al*, 1995; Probst *et al*, 1996; Li *et al*, 2011). De plus et notamment parce que la surexpression de la protéine Tau induit un déséquilibre important vers le transport rétrograde, le transport axonal se retrouve particulièrement perturbé dans certains modèles de tauopathies (Ishihara *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2005). Une étude récente suggère également que la phosphorylation de l'épitope AT8, qui est retrouvée dans les tauopathies (figure 5), gêne le déplacement des organites le long des microtubules (Shahpasand *et al*, 2012).

Dans la maladie d'Alzheimer et les tauopathies, la relocalisation de Tau ainsi que les perturbations du transport axonal sont associées à une perte synaptique importante (Pour revue (Spires-Jones & Hyman, 2014)). Mais la protéine Tau est multifonctionnelle et est aussi impliquée dans la transmission synaptique de manière directe ainsi que dans d'autres

fonctions telles que la protection de l'ADN.

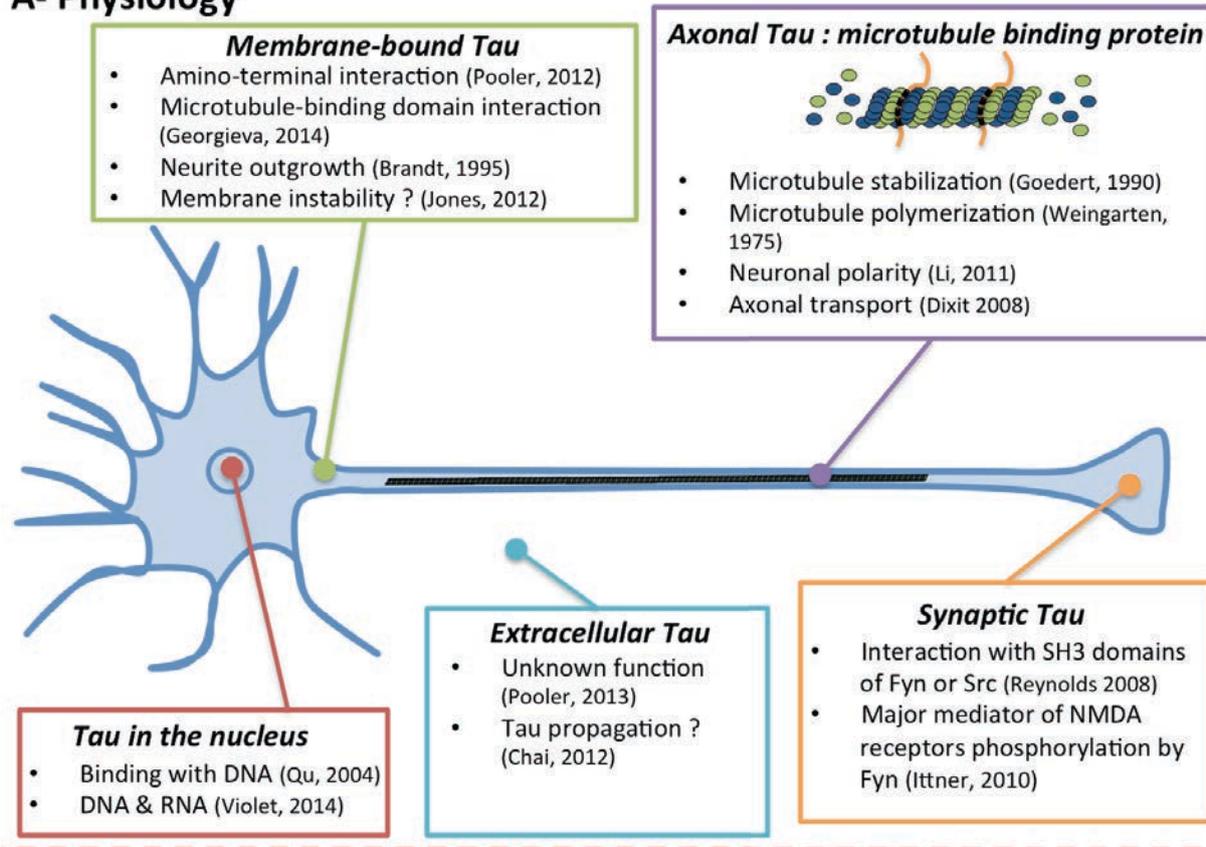
III.2. Autres fonctions de la protéine Tau (figure 7)

Outre sa localisation cytoplasmique majeure, il semble que la protéine Tau interagisse avec les mitochondries (Jancsik *et al*, 1989), avec l'appareil de Golgi (Farah *et al*, 2006) et qu'elle soit présente dans le noyau (Loomis *et al*, 1990). Si les interactions avec les mitochondries et l'appareil de Golgi suggèrent des fonctions physiologiques complémentaires elles restent totalement inconnues. Par contre, la présence de Tau dans le noyau est beaucoup plus documentée. Ainsi, dans le noyau, la protéine Tau est présente au sein du nucléole et serait capable de se lier directement à l'ADN (Qu *et al*, 2004; Sjöberg *et al*, 2006). Il semble que la fonction de cette liaison de la protéine Tau avec l'ADN soit de le protéger en cas de stress cellulaire. En effet, des travaux ont montré qu'en condition de stress thermique ou oxydant, la protéine Tau migre vers le noyau et se lie à l'ADN (Sultan *et al*, 2011). En outre, quand des souris déficientes en Tau sont utilisées, les dommages à l'ADN causés par le stress sont augmentés de manière significative (Violet *et al*, 2014).

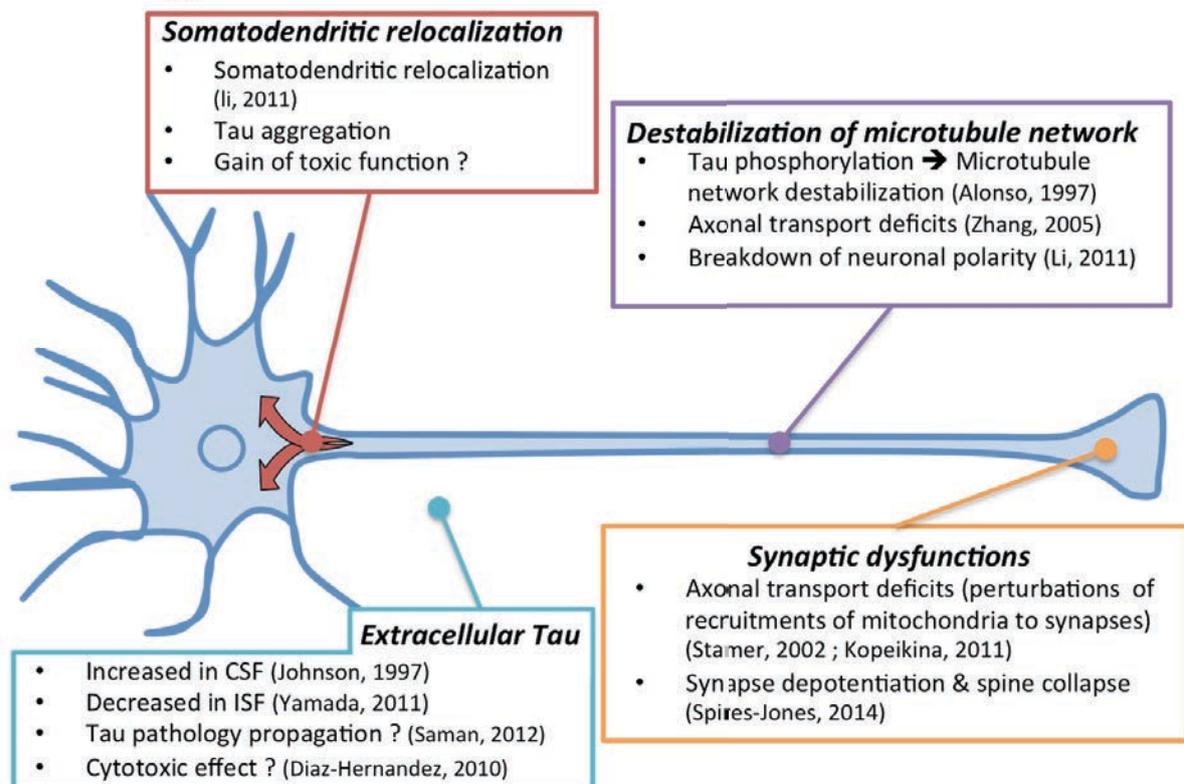
La protéine Tau étant capable d'interagir avec des protéines à domaine SH3 grâce à certains motifs dans son domaine riche en proline, plusieurs études ont documenté des interactions entre Tau et des protéines de la membrane plasmique comme Fyn ou Src ainsi que d'autres protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire (Lee *et al*, 1998; Reynolds *et al*, 2008). Ces résultats ont donc suggéré que la protéine Tau pourrait avoir un rôle au niveau de ses voies de signalisation ainsi qu'au niveau synaptique. En 2010, Ittner et collaborateurs ont en conséquence publié une étude significative montrant que la protéine Tau servirait de médiateur majeur au niveau de la synapse entre Fyn et les récepteurs NMDA. En effet, en cas d'absence de la protéine Tau, Fyn ne transite plus vers la synapse et n'y assure donc plus sa fonction clef de kinase des récepteurs NMDA (Ittner *et al*, 2010; Mondragón-Rodríguez *et al*, 2012). Via son interaction avec la kinase Fyn, la protéine Tau est ainsi présente au niveau de la membrane plasmique. Selon les modèles, il semble que jusqu'à 20% des protéines Tau soient localisées à la membrane plasmique (Pooler *et al*, 2012). Brandt et collaborateurs ont été les premiers à montrer la liaison d'une partie significative des protéines Tau avec la membrane dans un modèle cellulaire (Brandt *et al*, 1995). Les mécanismes de liaison de Tau à la membrane restent méconnus et plusieurs études s'opposent. Selon les premiers résultats, il semblerait que la partie amino-terminale de la protéine soit déterminante pour cette liaison (Brandt *et al*, 1995; Pooler *et al*, 2012; Pooler & Hanger, 2010) mais

d'autres études ont montré que le domaine de liaison aux microtubules interagit aussi de manière directe avec la membrane plasmique via des structures de types hélices amphiphatiques (Barré & Eliezer, 2006; Künze *et al*, 2012; Georgieva *et al*, 2014). Plusieurs études montrent aussi que les protéines Tau liées à la membrane sont en grande majorité déphosphorylées (Arrasate *et al*, 2000; Maas *et al*, 2000; Usardi *et al*, 2011; Pooler *et al*, 2012) et probablement dépendantes d'une liaison avec la protéine Fyn (Usardi *et al*, 2011; Pooler *et al*, 2012). Il semble également que les protéines Tau soient enrichies au niveau des domaines de la membrane résistants aux détergents comme les radeaux lipidiques (Kawarabayashi *et al*, 2004; Williamson *et al*, 2008). Une étude récente a par ailleurs montré dans un système artificiel en mono-couche lipidique que la protéine Tau change de conformation au contact de la membrane plasmique et entraîne une rupture de cette dernière (Jones *et al*, 2012). Ces derniers résultats sont à analyser avec prudence car il n'a jamais été rapporté d'augmentation drastique de la perméabilisation cellulaire suite à une surexpression de la protéine Tau. Par contre, il a été montré à plusieurs reprises que la protéine Tau est présente de manière libre dans le milieu extracellulaire ainsi que dans les fluides biologiques comme le LCR et cela sans mort cellulaire ce qui suggère un mécanisme de sortie (Johnson *et al*, 1997; Pooler *et al*, 2013a; Hanger *et al*, 2014). La fonction de cette protéine Tau extracellulaire reste inconnue également.

A- Physiology



B- Pathology



← **Figure 7 : Fonctions et dysfonctions des protéines Tau.** **A-** Physiologiquement, la protéine Tau est majoritairement présente dans l'axone au niveau cytoplasmique pour stabiliser les microtubules. D'autres localisations peuvent néanmoins être observées. Ainsi Tau se retrouve à la membrane et favorise la croissance neuritique, stabilise les acides nucléiques dans le noyau et favorise la transmission synaptique à la synapse. La protéine tau est aussi présente en extracellulaire. **B-** Durant les tauopathies, la protéine Tau est hyper- et anormalement phosphorylée puis s'agrège ce qui entraîne une perte de fonction importante. Notamment, le réseau microtubulaire est déstabilisé, la protéine est relocalisée en somato-dendritique et des défauts synaptiques apparaissent. Les protéines Tau extracellulaires sont modifiées sans que leurs fonctions ne soient totalement élucidées même si elles pourraient participer à la propagation de la pathologie dans le cerveau.

Figure 7: Functions and dysfunctions of Tau proteins. **A-** Physiologically, Tau protein is mainly located in the cytoplasm of axons to stabilize the microtubules. However, other locations can be observed. Indeed, Tau is retrieved at the plasma membrane and promotes neuritic outgrowth, stabilizes nucleic acids in the nucleus and promotes synaptic transmission. Tau proteins are also retrieved in the extracellular fluids. **B-** During tauopathies, Tau proteins are hyper- and abnormally phosphorylated and then aggregate leading to a substantial loss-of-function. Particularly, microtubule network is destabilized, Tau proteins are relocalized and synaptic deficits are appearing. Extracellular Tau proteins are modified and their functions are not completely understood even if they could participate to the Tau pathology propagation in the CNS.

Les tauopathies sont donc caractérisées au niveau moléculaire par l'agrégation intracytoplasmique de protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées en filaments insolubles. Même si l'ordre des événements reste inconnu, il semble que ces mécanismes moléculaires s'enchaînent dans un but fatal pour le neurone avec premièrement, et pour des raisons inconnues, une perturbation des MPT qui entraîne le détachement de la protéine Tau des microtubules et la déstabilisation du réseau microtubulaire. Le neurone perd alors sa polarité avec une relocalisation anarchique de la protéine Tau dans le compartiment somato-dendritique. Consécutivement, il semble qu'une activation des caspases se met en place et assez rapidement ensuite des lésions intracellulaires spécifiques appelées dégénérescences neurofibrillaires se forment (de Calignon et al, 2010). Ces DNF sont accompagnées de pertes de fonctions physiologiques majeures pour la protéine Tau ainsi que d'une perte synaptique importante. Même si les mécanismes moléculaires de formation de la DNF semblent très rapides (quelques jours à peine), les neurones seraient capables d'y résister et de survivre pendant plusieurs années (Kuchibhotla et al, 2014). Ensuite, les neurones finissent par mourir. Quand la perte neuronale est majeure, les premiers signes cliniques apparaissent alors chez les patients. Malgré ce constat simple, il existe une grande hétérogénéité au sein des tauopathies. En effet, en plus de tableaux cliniques très différents, les régions du cerveau impactées par la DNF, la morphologie des lésions et même leur composition moléculaire sont différentes.

IV. Chapter 2 summary: tauopathies, definition and molecular aspects

In 1906, Alois Alzheimer described for the first time morphologically fibrillary intraneuronal tangles in the brain of a patient with presenile dementia later named Alzheimer's disease (AD) (Alzheimer, 1907; Stelzmann *et al*, 1995 ; figure 3). In the middle of the 80s, Tau protein was identified as the major component of these lesions named neurofibrillary degeneration (NFD) or Tau pathology (Brion *et al*, 1985; Grundke-Iqbal *et al*, 1986b; 1986a; Ihara *et al*, 1986; Wood *et al*, 1986; Delacourte & Defossez, 1986; Goedert *et al*, 1988). NFD is not specific to AD and is retrieved in about twenty other neurodegenerative disorders known as tauopathies (table 1, for review: Spillantini & Goedert, 2013). Ultrastructurally, in the tauopathies, the fibers are mostly seen as paired helical filaments (PHFs) in electron microscopy but in some cases, straight filaments, wide filaments or twisted tubules can be retrieved (Kidd, 1963; Crowther, 1991; DeTure *et al*, 2002b; Bugiani *et al*, 1979 ; figure 3). Structurally, the PHF core is composed of the microtubule-binding region of Tau proteins (Wischik *et al*, 1988b; 1988a; Goedert *et al*, 1988). Several biochemical studies also showed that the fibers are highly structured with a high amount of beta-pleated sheets (Kidd, 1963; Gallyas, 1971; Braak *et al*, 1986; Guntern *et al*, 1992; Bergen *et al*, 2000; 2001; Mukrasch *et al*, 2005; Berriman *et al*, 2003; Barghorn *et al*, 2004; Inouye *et al*, 2006). A structural model has therefore emerged showing a core composed of the microtubule-binding region arranged in parallel beta-sheets with disordered amino and carboxy-terminal parts in the periphery (figure 4, Sillen *et al*, 2005). This model has not been conclusively demonstrated due to the difficulty to carry out complete structural studies on Tau protein.

Furthermore, an alteration of the secondary conformation appears on Tau protein during Tau pathology and was confirmed by the development of new antibodies such as TG-3, MC-1 or Alz-50 (Jicha *et al*, 1997b; 1997a). This antibodies MC-1 and Alz-50 are highly specific of Tau pathology and recognize an epitope resulting from the interaction of the amino-terminal part of Tau and the microtubule binding domain (residues 5-9 and 313-322 (Jicha *et al*, 1997a)) confirming the appearance of a conformational modification. It remains difficult to know whether this conformational change occurs before the aggregation of Tau or is a consequence of this process. As Tau proteins can aggregate in insoluble congophilic fibers highly ordered in beta-sheets, this protein can be considered as an amyloid (Mandelkow *et al*, 2007; Liberski, 2014).

Although several PTM are described on Tau proteins regulating the physiological functions of Tau but also some pathological mechanisms, the phosphorylation remains the most studied one. Phosphorylation was shown to dynamically regulate the physiological functions of Tau (for review: (Noble *et al*, 2013; Sergeant *et al*, 2008)). Firstly, the phosphorylation control the binding of Tau with microtubules (Drewes *et al*, 1997; Biernat *et al*, 1993; Sengupta *et al*, 1998; Schneider *et al*, 1999) and consequently regulates the microtubular dynamic and axonal transport (Lindwall & Cole, 1984; Cho & Johnson, 2004; Sibille *et al*, 2012) but also Tau localization in the cell (Maas *et al*, 2000; Pooler *et al*, 2012).

During tauopathies, Tau is hyper- and abnormally phosphorylated (Baner *et al*, 1989). Indeed, around 45 phosphorylation sites are described on Tau proteins extracted from aggregates principally in the amino-terminal part and the proline-rich region (figure 5). In comparison, physiologically, there are 10 phosphorylation sites on Tau (Hanger *et al*, 2007; Ksiezak-Reding *et al*, 1992) (for review: Noble *et al*, 2013). The discovery of these phosphorylation sites allowed for the development of immunological tools raised against some phosphorylation sites to detect NFD such as antibodies AT8 (physiological phosphorylation enhanced during pathologies), anti-phospho serine 422 (pathological phosphorylation), or AT100 (pathological phosphorylation dependant on an aggregated conformation) (Mercken *et al*, 1992; Porzig *et al*, 2007; Bussi re *et al*, 1999; Allen *et al*, 2002) (figure 5). Phosphorylation seemed to play a critical role in the pathological processes as, for instance, the overexpression of some kinases induces the formation of NFDs (Cruz *et al*, 2003; Xu *et al*, 2010).

Tau truncation is another PTM that was initially observed in the cerebrospinal fluid of patients suffering from AD (Wischik *et al*, 1988b; Johnson *et al*, 1997) and that is, to date, only described in a pathological context. Several cleavage sites were identified and are listed in figure 6 (Novak *et al*, 1993; Gamblin *et al*, 2003; Rissman *et al*, 2004; Rohn *et al*, 2002; Guo *et al*, 2004; Watanabe *et al*, 2004; Garg *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2014; Derisbourg *et al*, 2015). It is interesting to note that depending on tauopathies, the fragment profile seems to be variable and could constitute in the future a new diagnostic tool (Arai *et al*, 2004; Borroni *et al*, 2008; 2009; Wagshal *et al*, 2015). However, the role of truncation in the NFD is poorly understood even if Tau truncation seems to induce Tau aggregation (Abraha *et al*, 2000; Bergen *et al*, 2001; Frost *et al*, 2009a; Zilka *et al*, 2006; Hrnkova *et al*, 2007; de Calignon *et al*, 2010; McMillan *et al*, 2011). Consistent with the presence of Tau in the CSF, extracellular Tau proteins are often described as truncated (Johnson *et al*, 1997; Meredith *et al*, 2013; Amadoro *et al*, 2014; Saman *et al*, 2012; Plouffe *et al*, 2012).

Tauopathies are therefore regulated by several molecular dysfunctions with particularly PTM deregulations. These mechanisms are correlated with the appearance of conformational changes, oligomerization, and finally intracytoplasmic aggregation of Tau. All these processes have a significant impact on cell physiology and particularly on Tau functions. Thereby, important functions are ruled by the ability of Tau protein to bind microtubules. Indeed, physiologically, by interacting with microtubules, Tau promotes the microtubule assembly (Weingarten *et al*, 1975; Cleveland *et al*, 1977b; Drubin & Kirschner, 1986; Himmler *et al*, 1989; Ennulat *et al*, 1989; Goode *et al*, 1997), modulates the neuronal development (Caceres & Kosik, 1990; Caceres *et al*, 1991; Dawson *et al*, 2001; Brandt *et al*, 1995) and participates on the maintenance of the neuronal polarity (Binder *et al*, 1985; Dotti *et al*, 1987; Li *et al*, 2011). Tau proteins also regulate axonal transport favouring the retrograde transport (Vershinin *et al*, 2007; Seitz *et al*, 2002; Dixit *et al*, 2008). During the pathological processes, as a result of hyperphosphorylation and aggregation, Tau proteins are no longer able to bind to microtubules resulting in loss of physiological functions leading to the destabilization of the microtubule network, relocalization of Tau to the somato-dendritic part of the neuron and deregulations of the axonal transport (Alonso *et al*, 1997; Götz *et al*, 1995; Probst *et al*, 1996; Li *et al*, 2011; Ishihara *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2005).

Physiologically, other minor locations of Tau can be observed, such as in the nucleus (Loomis *et al*, 1990), bound to the membranes (Brandt *et al*, 1995) and in the synapses (Ittner *et al*, 2010). These locations are associated with atypical functions of Tau (figure 7), such as protecting nucleic acids from stress (Sultan *et al*, 2011; Violet *et al*, 2014), or mediator in the synapse between the Fyn kinase and NMDA receptors (Ittner *et al*, 2010; Mondragón-Rodríguez *et al*, 2012).

In conclusion, tauopathies are characterized molecularly by the intracytoplasmic aggregation of hyper- and abnormally phosphorylated Tau proteins forming insoluble fibers. The sequence of events is still unknown but precociously, a deregulation in the PTM leads to the detachment of Tau from microtubules and the destabilization of the microtubular network. Thus, the neuron loses its polarity with an anarchical relocalization of Tau proteins. Consequently, after a transitory activation of caspases, the lesions named NFD are appearing (de Calignon *et al*, 2010). These NFD go along with massive loss-of-function of Tau protein but also synaptic deficits (for review: (Spires-Jones & Hyman, 2014)). The NFD formation is relatively quick (few days), but neurons are able to hang on and to survive several years (Kuchibhotla *et al*, 2014). Then neurons eventually die. When neuronal loss is massive, the first clinical evidence of cognitive decline appears in patients. Despite this simple view of Tau

pathology, a great heterogeneity is encountered within tauopathies (Kovacs, 2015). Indeed, in addition to very different clinical pathologies, the brain regions affected by the NFD, the morphology of lesions and even their molecular compositions are different.

Chapitre 3 : Les tauopathies, un groupe très hétérogène

Toutes les tauopathies sont caractérisées par l'agrégation de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées. En conséquence de cette définition assez large, ces pathologies sont très hétérogènes en terme de cause, de morphologies et compositions des lésions, de durée d'évolution de la pathologie ainsi que de zones du cerveau impactées ce qui implique des tableaux cliniques très variés avec des recoupements importants entre pathologies. De plus, cette hétérogénéité rend très difficile la classification de ce groupe de pathologies. On distingue notamment les tauopathies dites primaires comme la démence à grains argyrophiles (DGA) ou la maladie de Pick, dans lesquelles l'agrégation de la protéine Tau semble être majeure, des tauopathies secondaires, dans lesquelles la pathologie Tau est une conséquence d'autres mécanismes pathologiques, comme dans le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker. Par la suite, à défaut d'être exhaustif dans la description des tauopathies, nous essaierons de faire ressortir des différences pertinentes et d'approfondir les pathologies qui semblent d'intérêt pour la suite de ce travail.

I. Les causes des tauopathies : tauopathies sporadiques versus tauopathies familiales

Trouver ce qui cause une pathologie est toujours un challenge important en terme de recherche. Dans le cas des tauopathies, les causes sont multiples mais nous opposerons deux groupes : les tauopathies sporadiques qui sont majoritaires et les tauopathies avec une cause génétique comme les démences fronto-temporales avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17).

I.1. Tauopathies sporadiques

Dans la grande majorité des cas, les causes des tauopathies sporadiques restent méconnues. Nous pouvons juste ressortir les trois tauopathies suivantes pour qui la cause est clairement identifiée : les encéphalopathies traumatiques chroniques qui sont dues à des

commotions cérébrales répétées notamment chez les sportifs comme les boxeurs, les formes de parkinsonisme de Guadeloupe dues à des toxines végétales consommées par les populations locales et enfin les Panencéphalites sclérosantes subaigües dues à l'infection par le virus de la rougeole.

Pour la maladie d'Alzheimer, la plus répandue et la plus étudiée des tauopathies, le facteur de risque le plus important reste l'âge même s'il semble qu'il y ait un terrain de susceptibilité génétique. En effet, plus de 20 loci ont été identifiés par des études d'association pangénomique plus connues sous l'acronyme anglophone GWAS (pour genome-wide association study) avec plusieurs gènes de susceptibilité d'ores et déjà identifiés comme les gènes ApoE, BIN1 ou CLU (pour revue : (Reitz & Mayeux, 2014)). Par ailleurs, plusieurs études ont montré des facteurs de risques environnementaux que ce soit au niveau de la pollution, de l'alimentation ou encore de l'exercice physique ((Chen *et al*, 2012; Leboucher *et al*, 2013; Belarbi *et al*, 2011) pour revue : (Chin-Chan *et al*, 2015)).

A ce jour, dans les autres tauopathies sporadiques qui ont été décrites, et notamment la paralysie supranucléaire progressive, la démence à grains argyrophyles (AGD) ou encore la maladie de Pick (PiD), il n'y a pas ou peu de causes clairement identifiées.

I.2. Tauopathies avec cause génétique

Au contraire des tauopathies sporadiques, certaines tauopathies ont une cause génétique. Ces formes sont en général extrêmement rares et principalement dues à des mutations. Ainsi, nous pouvons citer, entre autres, la trisomie 21, la dystrophie myotonique (expansion triplet CTG du gène DMPK), la maladie de Niemann-Pick de type C (mutations des gènes NPC1 ou NPC2), les démences familiales danoise et britanniques (mutations du gène BRI2), ou encore les angiopathies amyloïdes cérébrales à protéines prion (mutation du gène PRNP) (Ghetti *et al*, 1996).

Les démences fronto-temporales avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17) vont principalement nous intéresser par la suite car elles sont les seules tauopathies familiales avec des mutations autosomales dominantes du gène MAPT. En effet, en 1998, plusieurs travaux identifient pour la première fois un ensemble de mutations introniques et exoniques du gène MAPT qui causent des démences fronto-temporales familiales préséniles (Poorkaj *et al*, 1998; Hutton *et al*, 1998; Spillantini *et al*, 1998; Dumanchin *et al*, 1998; Clark *et al*, 1998). Depuis cette découverte, des études extensives ont mené à l'identification de 53 mutations différentes du gène MAPT dans environ 150 familles réparties dans le monde entier

(figure 8, pour revue : Ghetti *et al*, 2015). La grande majorité de ces mutations sont situées dans le domaine de liaison aux microtubules et ont pour conséquence première une capacité d'interaction avec les microtubules réduite (Hasegawa *et al*, 1998; Hong *et al*, 1998; Barghorn *et al*, 2000; Rossi *et al*, 2012). Les mutations du gène MAPT entraînent également des changements structuraux au niveau de la protéine soluble (Barghorn *et al*, 2000), mais également au niveau des fibres (Frost *et al*, 2009b). Certaines mutations (notamment les mutations introniques ainsi que les mutations de l'exon 10) causent des différences d'épissage souvent à l'origine d'un déséquilibre avec une augmentation d'isoformes 4R (Hutton *et al*, 1998; D'Souza *et al*, 1999; D'Souza & Schellenberg, 2002). En outre, une caractéristique majeure des mutations sur le gène MAPT est qu'elles entraînent la formation de protéines Tau avec une nucléation et une fibrillogenèse plus rapides et plus importantes (Barghorn *et al*, 2000; Chang *et al*, 2008). Toutes ces caractéristiques ont mené à une large utilisation de ces mutations dans l'étude des mécanismes physiopathologiques des tauopathies notamment pour comprendre les mécanismes d'agrégation de la protéine Tau. En outre, prenant avantage de la facilité à former des fibres de Tau à partir de ces mutations, de nombreux modèles animaux ont été mis au point notamment avec les mutations P301S et P301L. En effet, au contraire des animaux exprimant une protéine Tau sauvage, la plupart des modèles transgéniques exprimant une protéine Tau mutée mènent à une DNF rapide et agressive avec des protéines Tau fibrillaires insolubles ainsi qu'hyper- et anormalement phosphorylées. Dans la majorité des cas, une localisation somato-dendritique de la protéine est observée. Ces modèles animaux sont passés en revue dans l'annexe 2 (Dujardin *et al*, 2015).

Les tauopathies sont donc hétérogènes en terme de cause avec une opposition entre les tauopathies sporadiques dont on ne connaît majoritairement pas les causes et les tauopathies dues à des défauts génétiques comme les FTDP-17. Ces dernières sont dues à des mutations du gène MAPT qui mènent à la formation de protéines Tau pro-agrégatives et régulièrement à des défauts d'épissage à l'origine d'un déséquilibre du ratio entre isoformes 3R/4R. Les FTDP-17 ne sont d'ailleurs pas les seules tauopathies présentant ce genre de déséquilibre.

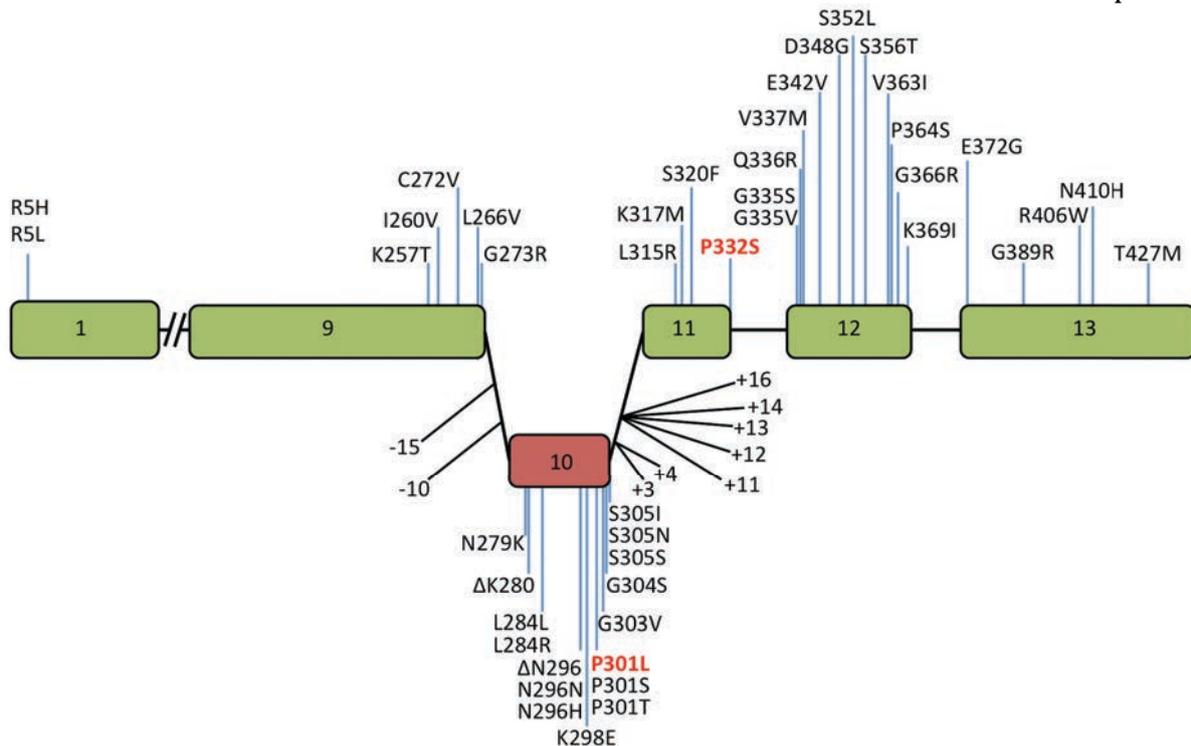


Figure 8 : Mutations répertoriées sur le gène MAPT. Représentation schématique des exons et introns du gène MAPT et distribution des 53 mutations répertoriées sur ce gène et causant des formes de FTDP-17. 9 sont introniques, 44 exoniques. En rouge, les mutations P301L et P332S seront utilisées dans la suite de l'étude. Modifiée depuis (Ghetti *et al*, 2015)

Figure 8: Mutations on MAPT gene. Schematic representation of exons and introns of MAPT gene and distribution of the 53 identified mutations on this gene that cause Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). 9 mutations are located in the introns whereas 44 are exonic. In red, mutations P301L and P332S are used in the following study. Modified from (Ghetti *et al*, 2015)

II. Différentes signatures en isoformes selon les tauopathies

Après la mise en évidence des tauopathies, des études biochimiques comparatives ont été menées et ont montré des profils électrophorétiques très différents selon les tauopathies. Nous pouvons ainsi retrouver 4 groupes distincts de tauopathies avec des contenus en isoformes dissemblables et notamment des déséquilibres entre isoformes 3R et 4R alors que dans un cerveau normal, le ratio 3R/4R est équimolaire (figure 9, pour revue Buée *et al*, 2000; Sergeant *et al*, 2008).

II.1. Groupe 1 : toutes les isoformes de Tau s'agrègent

Dès l'identification de la protéine Tau comme principal composant des PHF dans la

maladie d'Alzheimer, il a été montré la présence d'isoformes 3R et 4R au sein des PHF sans qu'ils soient bien caractérisés (Wischik *et al*, 1988b). Des études biochimiques plus poussées ont ensuite confirmé ces données en démontrant que les six isoformes de Tau sont présentes dans les PHFs (Goedert *et al*, 1992; Sergeant *et al*, 1997a; Buée & Delacourte, 1999; Hasegawa *et al*, 2014). Certaines études par immunohistochimie ont aussi déterminé que tous les neurones atteints de DNF n'avaient pas la même immunoréactivité pour des anticorps spécifiques des isoformes 3R et des isoformes 4R selon leur localisation et l'état d'avancement de la DNF (Hara *et al*, 2013; Espinoza *et al*, 2008). Ces données sont discutées dans une étude récente montrant que ces résultats sont probablement dus au masquage de l'épitope de l'anticorps spécifique des isoformes 4R et que les isoformes 3R et 4R co-agrègent bien dans la MA (Hasegawa *et al*, 2014). De plus, une controverse existe sur l'existence ou non d'un défaut d'épissage de l'exon 10 qui favoriserait les isoformes 4R dans la MA (Glatz *et al*, 2006; Ingelsson *et al*, 2006).

Outre la MA, plusieurs autres tauopathies dont la trisomie 21, certaines FTDP-17, la maladie de Niemann-Pick de type C ou encore l'encéphalopathie traumatique chronique présentent ce profil typique d'agrégation des six isoformes de Tau (figure 9).

II.2. Groupe 2 : seuls les isoformes 4R de Tau sont retrouvés dans les lésions

Le deuxième profil correspond à des tauopathies avec une agrégation d'isoformes 4R de Tau essentiellement. Ce profil est retrouvé dans la dégénérescence cortico-basale (CBD), l'AGD, la PSP et également comme expliqué précédemment, dans certaines FTDP-17 (Sergeant *et al*, 1999; Tolnay *et al*, 2002; Buée & Delacourte, 1999 ; figure 9).

II.3. Groupe 3 : seuls les isoformes 3R de Tau s'agrègent

Au contraire du groupe précédent, la maladie de Pick et certaines formes de FTDP-17 sont caractérisées par l'agrégation d'isoformes 3R de la protéine Tau (Sergeant *et al*, 1997b). Une autre caractéristique intéressante de la maladie de Pick est qu'à l'inverse des autres tauopathies, les protéines Tau agrégées ne sont pas phosphorylées sur les résidus Ser262/Ser356 (Mailliot *et al*, 1998) (figure 9).

II.4. Groupe 4 : seuls l'isoforme 0N3R est retrouvé dans les fibres

Les dystrophies myotoniques de type I et II sont les seules pathologies dans lesquelles uniquement l'isoforme 0N3R s'agrège. Le profil électrophorétique est donc tout à fait particulier avec une bande importante de masse moléculaire apparente 60 kDa (Sergeant *et al*, 2001). Ce profil est dû à de profondes altérations de l'épissage alternatif du gène MAPT dans ces pathologies (Maurage *et al*, 2005 ; figure 9).

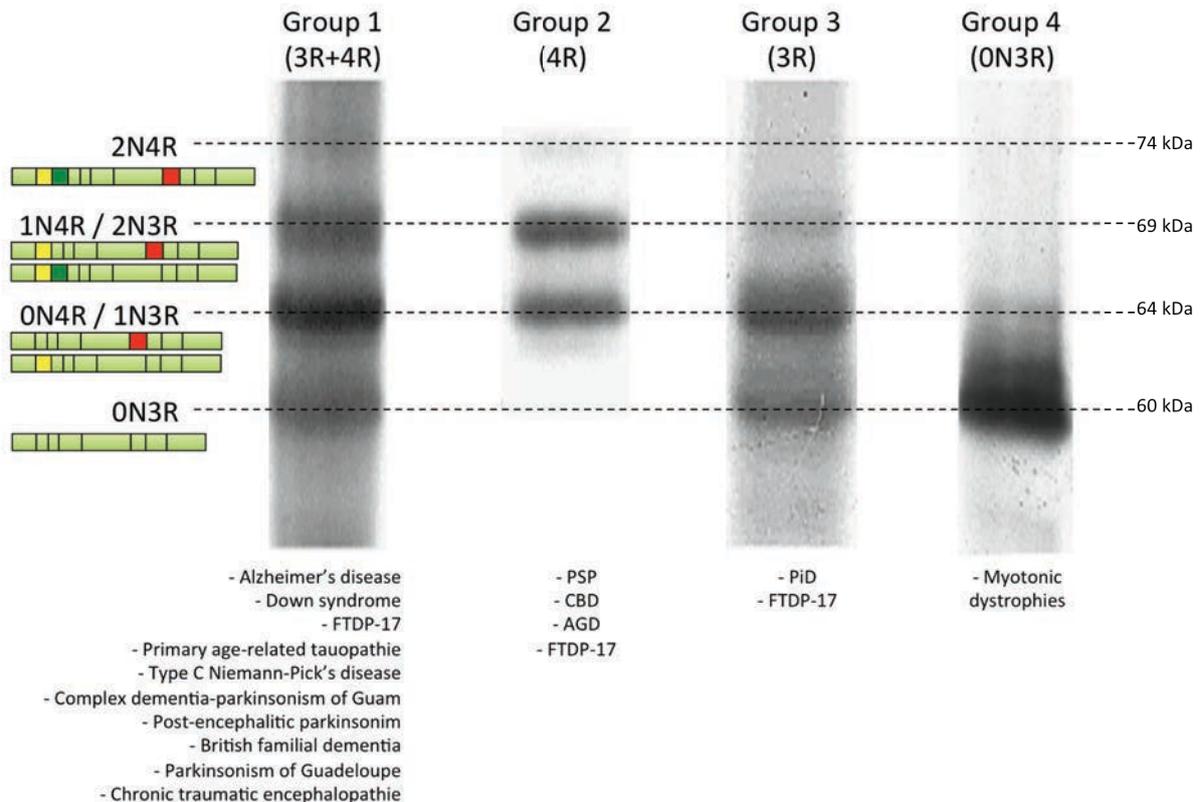


Figure 9 : Code barre des tauopathies. Western blots représentant le profil électrophorétique observé avec des agrégats de protéines Tau provenant de patients atteints de différentes tauopathies. Dans les tauopathies du groupe 1, les six isoformes de Tau sont présentes dans les agrégats. Dans le groupe 2, seulement les protéines Tau 4R s'agrègent. Dans le groupe 3, seuls les isoformes 3R s'agrègent. Enfin, dans le groupe 4, seul l'isoforme 0N3R s'agrège. Modifié de (Sergeant *et al*, 2008)

Figure 9: Tauopathies barcode. Western blots showing the electrophoretic profile observed with Tau protein aggregates coming from patients with different tauopathies. In the tauopathies of group 1, the six Tau isoforms are present in the aggregates. In group 2, only the 4R-Tau proteins are aggregating. In group 3, only the 3R isoforms are aggregating. Finally, in group 4, the only 0N3R isoform aggregates. Modified from (Sergeant *et al*, 2008)

Avec plusieurs causes et plusieurs compositions moléculaires des lésions, les tauopathies sont sans nul doute très différentes les unes des autres. Mais l'hétérogénéité ne s'arrête pas là car toutes ces tauopathies présentent des tableaux cliniques très variables.

III. Des tableaux cliniques bien différents

Au sein des pathologies neurodégénératives, les tauopathies font partie du groupe des protéinopathies qui est défini par des altérations conformationnelles de protéines qui s'agrègent et entraînent la mort neuronale. Ce groupe inclut les synucléinopathies comme la maladie de Parkinson, les maladies avec agrégation des protéines TDP-43 (pour 'transactive response DNA-binding protein') ou FUS (pour 'fused in sarcoma'), les maladies à prion ainsi que les amyloïdoses. Dans ces pathologies, les symptômes observés chez les patients sont, de manière générale, étroitement liés aux régions anatomiques cérébrales touchées par la maladie (figure 10). Ainsi, pendant l'évolution de ces pathologies, une constellation complexe de symptômes se met en place reflétant plus le nombre croissant de régions touchées que les aspects moléculaires de la pathologie. Par conséquent, différentes protéinopathies peuvent présenter des tableaux cliniques similaires ce qui entraîne des difficultés lors du diagnostic des tauopathies (Kovacs, 2015). De plus, l'identification finale de tauopathies ne se fait que post-mortem lors de l'analyse neuro-pathologique. Cependant certaines associations de symptômes sont suggestives de tauopathies spécifiques et peuvent être classées en différents sous-groupes même si de nombreux cas de recoupement ou d'hétérogénéité entre pathologies existent.

III.1. **Maladies de type Alzheimer**

Plusieurs tauopathies dont la MA sont majoritairement caractérisées cliniquement par un déclin cognitif de type Alzheimer évoluant en démence dans des stades tardifs. La démence est définie par un déclin significatif des fonctions cognitives par rapport au niveau attendu associé à une perte d'autonomie fonctionnelle (notamment pour les activités de la vie quotidienne). Dans la MA, ce déclin se met en place de manière progressive. A cause de l'atteinte majeure de l'hippocampe et des zones temporales (figure 10A-B), le premier signe d'une maladie de type Alzheimer est souvent la perte de mémoire (particulièrement la mémoire de travail et la mémoire épisodique), suivie par l'aphasie (troubles du langage), l'agnosie (difficultés de reconnaissance des objets, des personnes), l'apraxie (difficulté et/ou incapacité à réaliser des gestes appris) ainsi que d'atteintes comportementales potentielles (notamment apathie et agressivité). Ces derniers apparaissent souvent plus tardivement quand des zones plus frontales sont touchées. Outre la MA, d'autres tauopathies comme l'AGD ou encore la tauopathie primaire liée à l'âge sont aussi susceptibles de présenter un déclin de

type Alzheimer.

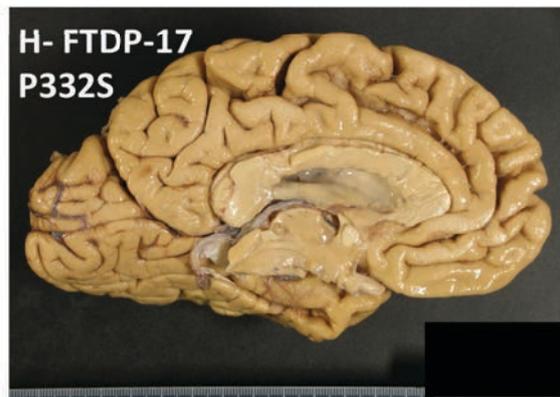
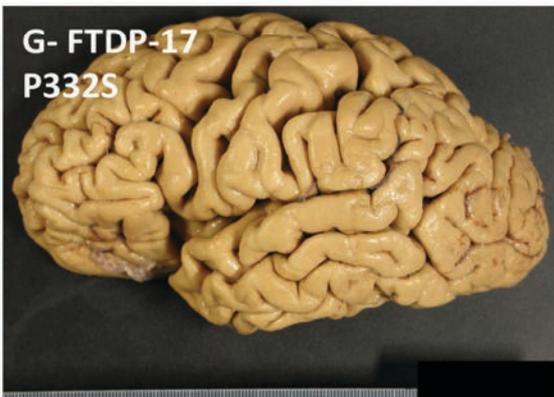
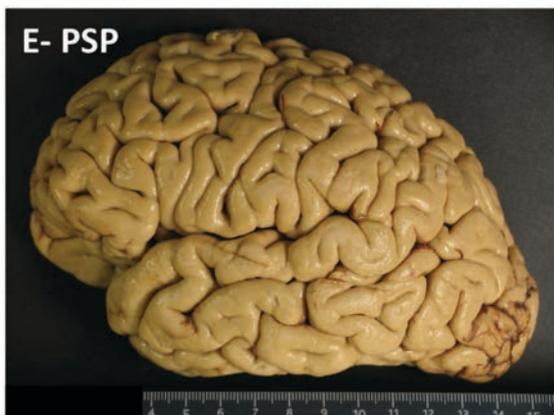
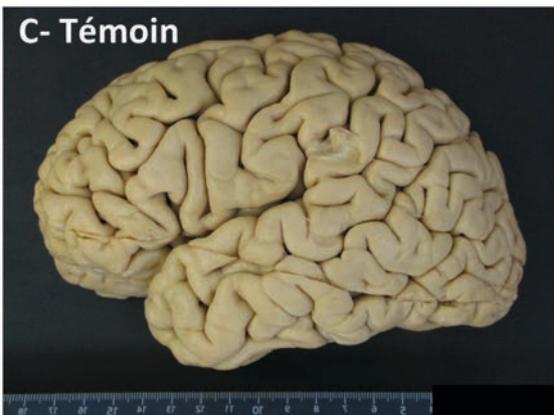
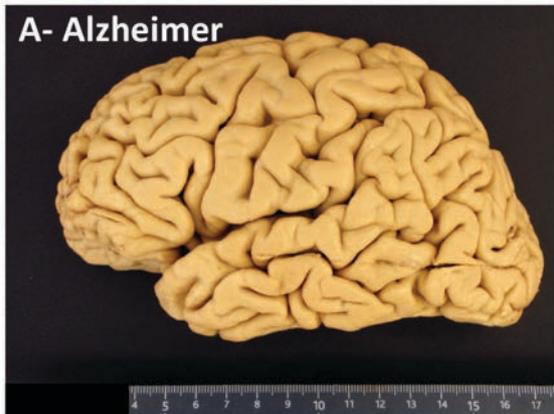
III.2. Démences fronto-temporales / variante comportementale

L'atteinte fronto-temporale importante observée dans une grande partie des tauopathies (figure 10D) entraîne l'apparition de graves troubles comportementaux appelés démences fronto-temporales variante comportementale. Même si les troubles de langage et de la mémoire sont très régulièrement associés aux démences fronto-temporales, ce sont bien ces troubles du comportement qui sont la caractéristique clinique commune à toutes ces pathologies. Ils représentent en effet le principal critère diagnostique des démences fronto-temporales avec notamment la désinhibition, l'apathie, la perte de sympathie / d'empathie, les comportements compulsifs, l'hyperoralité, ainsi qu'un profil neuropsychologique dysexécutif (McKhann *et al*, 2001; Cairns *et al*, 2007; Rascovsky *et al*, 2011; Galimberti *et al*, 2015). Ce tableau clinique est régulièrement observé notamment chez les patients atteints de la maladie de Pick, de dégénérescences lobaires fronto-temporales ainsi que beaucoup de cas de FTDP-17 (figure 10G-H).

III.3. Syndromes parkinsoniens atypiques

Le troisième groupe de symptômes cliniques retrouvés dans les tauopathies est tout à fait distinct car il regroupe toutes les maladies avec une pathologie du mouvement. Ces symptômes sont généralement la conséquence d'atteintes des ganglions de la base comme la substance noire, ainsi que des cortex prémoteurs et moteurs (figure 10E-F). Ces pathologies présentent ainsi toutes un syndrome parkinsonien atypique aussi appelé syndrome extrapyramidal. Ces pathologies sont notamment caractérisées par une akinésie (raréfaction et lenteur de l'activité motrice) ainsi qu'une hypertonie (rigidité musculaire) et/ou des tremblements de repos. Les pathologies présentes dans ce groupe sont comme leurs noms l'indiquent la démence parkinsonienne, le complexe démence-parkinsonisme de l'île de Guam, le syndrome Parkinsonien post-encéphalitique, mais aussi et surtout la PSP et la CBD. Cliniquement, la forme classique de PSP est ainsi caractérisée par une paralysie supranucléaire verticale du regard, une instabilité posturale sévère ainsi que des dystonies. La démence est un symptôme des formes plus sévères de la pathologie (Litvan, 1997). Dans le cas de la CBD, dans la majorité des cas, un syndrome corticobasal est retrouvé avec une présentation asymétrique du syndrome parkinsonien, des dystonies, des perturbations

oculomotrices, une apraxie, ainsi qu'une aphasie (Armstrong *et al*, 2013).



← **Figure 10 : Neuropathologie macroscopique de différentes tauopathies.** Photographies représentatives de cerveaux humains chez des patients atteints de tauopathies. **A/B-** vues latérale et médiale du cerveau d'un patient atteint de MA montrant une atrophie importante du cortex et du lobe temporal. **C-** vue latérale d'un cerveau témoin. **D-** Vue latérale du cerveau d'un patient atteint de maladie de Pick montrant une profonde atrophie frontale. **E-** Vue latérale du cerveau d'un patient atteint de PSP montrant une petite atrophie du cortex moteur. **F-** Photographie du mésencéphale d'un patient atteint de PSP montrant la décoloration caractéristique de la substance noire. **G-H-** vues latérale et médiale du cerveau d'un patient atteint de FTDP-17 avec une mutation P332S - (Images aimablement offertes par le Dr Vincent Deramecourt)

Figure 10: macroscopic neuropathology in the different tauopathies. Representative pictures of human brains of patients with tauopathies. **A/B-** lateral and medial pictures of the brain of an AD patient showing a profound cortical and temporal atrophy. **C-** lateral picture of a control brain. **D-** lateral picture of the brain of a patient with a Pick's disease showing a major frontal atrophy. **E-** lateral picture of the brain of a patient with a Progressive Supranuclear Palsy (PSP) showing a weak atrophy of the motor cortex. **F-** Mesencephalon from a patient with PSP showing a typical decoloration of the substantia nigra. **G/H-** lateral and medial pictures of a patient with FTDP-17 caused by the P332S mutation – (Images courtesy of Dr Vincent Deramecourt)

En conclusion, la symptomatique des tauopathies nous permet de définir trois groupes distincts : un groupe dont les caractéristiques principales sont les pertes de mémoire et l'établissement d'une démence, un groupe avec des troubles comportementaux importants et enfin un groupe avec des symptômes moteurs. Nous pouvons souligner qu'il existe des recouvrements entre ces groupes. Par exemple une part significative de patients atteints de CBD présentent un tableau clinique de type Alzheimer ou PSP (Boeve, 2011). Aussi, des patients atteints d'AGD ont régulièrement des atteintes motrices ou comportementales. Dans le cas des FTDP-17, selon les mutations, il apparaît également que le phénotype clinique est souvent différent (Ghetti *et al*, 2015). Ainsi pour confirmer un diagnostic de tauopathie de manière certaine, il est nécessaire de recourir à une analyse neuropathologique en histologie notamment pour mettre en évidence les lésions, leurs morphologies, leurs compositions et leurs répartitions dans les régions neuro-anatomiques (Montine *et al*, 2012).

IV. Caractéristiques et évolutions neuropathologiques des tauopathies.

Suivant de manière logique les différences observées au niveau des symptômes, il existe des différences neuropathologiques importantes entre les tauopathies. Ainsi, selon les tauopathies, les régions impactées par la pathologie Tau sont différentes. De plus, la pathologie Tau évolue différemment selon les tauopathies et il a été montré que dans certaines d'entre elles, la DNF évolue dans l'espace et dans le temps de manière hiérarchique et stéréotypée. Nous détaillerons ces stades d'évolution tout à fait particuliers.

IV.1. Neuropathologie générale

Même si certains signes cliniques sont assez caractéristiques des tauopathies, le diagnostic final de celles-ci repose avant tout sur des critères neuropathologiques bien définis. Ces critères sont principalement : la morphologie des lésions, leurs compositions en isoformes ainsi que les régions touchées par la pathologie (Pour revue : (Kovacs, 2015)).

Ainsi au niveau morphologique, nous pouvons retrouver dans une majorité de tauopathies des enchevêtrements neurofibrillaires neuronaux ou « neurofibrillary tangles » (NFT) en anglais qui sont des neurones dont la partie somato-dendritique est complètement remplie de protéines Tau fibrillaires et insolubles qui ont donc une forme de flamme après imprégnation argentique ou marquages immunohistochimiques notamment. Ces NFTs sont retrouvées dans quasiment toutes les tauopathies et particulièrement dans la MA. Les NFTs sont en général associés à la présence de filaments du neuropile et de neurites dystrophiques (respectivement ‘neuropil threads’ et ‘dystrophic neurites’) (figure 11).

Dans la maladie de Pick, les lésions caractéristiques sont les corps de Pick. Ce sont des inclusions de Tau somatiques, très denses, de forme ronde et proches du noyau de la cellule. Dans certaines tauopathies et particulièrement dans la PSP et la CBD, des lésions gliales sont également retrouvées et notamment des plaques astrocytaires, des astrocytes en touffe ainsi que des corps bobinés oligodendrogliaux (respectivement ‘astrocytic plaques’, ‘tufted astrocytes’ et ‘oligodendroglial coiled bodies’ en anglais) (figure 11).

En plus de la morphologie des lésions, les différences neuropathologiques résident également dans les régions atteintes par la pathologie. Ainsi, dans la maladie de Pick, des corps de Pick peuvent être observés dans les cortex frontaux et temporaux ainsi que dans les cellules granulaires du gyrus denté et de l’hippocampe entraînant une atrophie importante des lobes frontaux et temporaux. Par contre, la CBD est caractérisée par une atrophie corticale focale asymétrique avec des NFT, ainsi que des corps bobinés et des plaques astrocytaires dans le cortex et dans le striatum. La CBD est donc très étendue dans le système cérébral sans qu’une évolution spatio-temporelle particulière n’ait été décrite, à ce jour, pour cette pathologie (Williams, 2006; Kovacs, 2015).

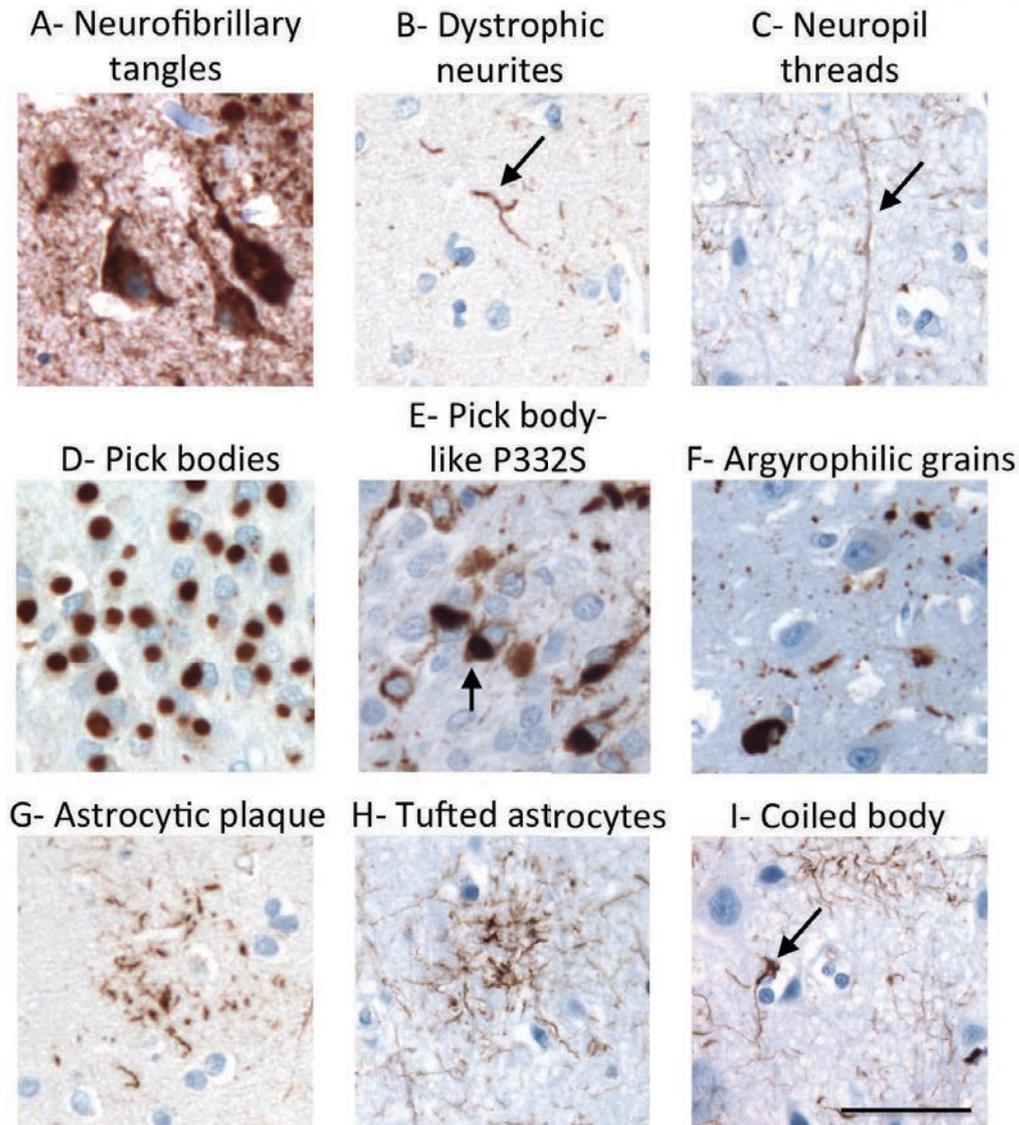


Figure 11 : Neuropathologie microscopique des tauopathies. Résultats d'immunohistochimie avec l'anticorps AD2 (voir figure 5) montrant les différentes lésions caractéristiques des tauopathies. **A-** NFTs observées dans la CA1 d'un patient atteint de MA. **B/C-** neurite dystrophique et filaments du neuropile observés dans le cortex moteur primaire d'un patient atteint de MA. **D-** corps de Pick observés dans le gyrus denté d'un patient atteint de maladie de Pick. **E-** structures de type corps de Pick observées dans le gyrus denté d'un patient atteint de FTDP-17 causé par la mutation P332S. **F-** grains argyrophiles observés dans la CA1 d'un patient atteint d'AGD. **G/H/I-** respectivement, plaque astrocytaire, astrocyte en touffe et corps bobiné oligodendroglial observé chez un patient atteint de DCB dans le lobe temporal. Barre d'échelle = 50µm (Images aimablement fournies par le Dr Vincent Deramecourt)

Figure 11: microscopic neuropathology of tauopathies. Immunohistochemical results with AD2 antibody (See figure 5) showing the typical lesions observed in tauopathies. **A-** neurofibrillary tangles (NFTs) observed within the CA1 of a patient with AD. **B/C-** dystrophic neurites and neuropil filaments observed in the primary motor cortex of a patient with AD. **D-** Pick's bodies observed in the dentate gyrus of a patient with Pick's disease. **E-** Pick's body-like structures observed in the dentate gyrus with a FTDP-17 caused by a P332S mutation. **F-** argyrophilic grains observed in the CA1 of a patient with argyrophilic grain disease (AGD). **G/H/I-** Respectively, astrocytic plaque, tufted astrocyte and oligodendroglial coiled body observed in the temporal lobe of a patient with cortical basal degeneration (CBD). Scale bar = 50µm (Images courtesy of Dr Vincent Deramecourt).

Pour les FTDP-17, les données neuropathologiques, que ce soit la morphologie des lésions ou les régions impactées varient énormément en fonction des mutations. De manière générale, les inclusions de protéines Tau sont abondantes dans le cortex cérébral, la substance blanche et les noyaux sous-corticaux entraînant une atrophie de ces régions. La présence de pathologie Tau dans les autres régions est plus variable. Dans les cas avancés, l'atrophie est présente dans beaucoup de régions et notamment dans les lobes fronto-temporaux ainsi que la formation hippocampique et l'hypothalamus (Ghetti *et al*, 2015). Nous prendrons l'exemple de deux mutations qui vont nous servir dans la suite de cette étude : la mutation P301L et la mutation P332S (voir figure 8). La mutation P301L est une des premières mutations à avoir été identifiée. Il semble qu'il y ait une hétérogénéité inter-sujet importante, mais chez les porteurs de cette mutation, l'atrophie des cortex frontaux et temporaux est très marquée résultant d'une pathologie neuronale et gliale importante. L'amygdale et la substance noire sont également très touchées. Par contre, les cerveaux contiennent de manière variable des NFT, des corps de Pick, de la pathologie gliale (Bird *et al*, 1999). La mutation P332S a, quant à elle, été découverte à Lille et décrite en 2012 dans une étude à laquelle notre groupe de recherche a participé (Deramecourt *et al*, 2012, annexe 3). Elle est beaucoup plus rare et moins caractérisée que la mutation P301L mais il semble qu'elle soit à l'origine d'inclusions en forme de corps de Pick qui sont réparties au sein du cortex primaire, du lobe temporal mais surtout au sein de l'hippocampe dans l'aire 1 de la corne d'Ammon (CA1) ainsi que le gyrus denté entraînant une atrophie importante de toutes ces régions (Deramecourt *et al*, 2012, annexe 3, figures 10 et 11). Comme pour la CBD, dans les FTDP-17 il n'y pas de description d'évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau. Celle-ci serait très probablement difficile à mettre en évidence, la mutation étant présente de manière constitutive dans toutes les cellules.

IV.2. Evolutions spatio-temporelles de certaines tauopathies

Dans certaines tauopathies sporadiques par contre, il a été démontré que la pathologie Tau évoluait dans le système cérébral de région en région de manière hiérarchique et stéréotypée. C'est le cas pour la MA, la PSP et l'AGD (figures 12-13-14).

IV.2.1. Les stades de Braak dans la maladie d'Alzheimer (figure 12)

S'il est une pathologie dans laquelle cette évolution spatio-temporelle est

particulièrement bien décrite, c'est la MA. Des stades bien définis ont été décrits notamment par l'équipe du Dr Braak et sont maintenant acceptés par tous (Pour revue : (Braak & Del Tredici, 2011b; Braak *et al*, 2011; Braak & Del Tredici, 2013)). Depuis 1991 et les premières études ayant décrit l'évolution spatio-temporelle et ayant défini ces stades, les cerveaux de plus de 2300 patients de tout âge ont été récupérés et analysés en histologie pour déterminer ces stades (Braak & Braak, 1991; Arnold *et al*, 1991).

IV.2.1.1. Les stades « pre-tangle »

De manière surprenante, dans des études très récentes sur un grand nombre de cerveaux de sujets jeunes, l'équipe du Dr Braak a déterminé que les patients présentaient les premiers signes de pathologie Tau très rapidement. En effet, d'après cette étude, la pathologie Tau commence entre 10 et 30 ans environ dans certains noyaux du tronc cérébral et notamment le locus coeruleus. Cette étape est appelée le stade de « pre-tangle ». Ce stade correspond à des neurones contenant des protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées mais encore solubles. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse dans leurs différentes publications que ce stade correspondrait au début de la maladie d'Alzheimer (Braak *et al*, 2011; Braak & Del Tredici, 2011a). Cependant, il est difficile à ce jour de savoir si ce stade est vraiment prédictif de la MA car il n'est détectable qu'après autopsie des cerveaux, qu'il est présent chez quasiment tous les sujets analysés et qu'il n'est pas montré que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau est irréversible (Duyckaerts, 2011). Cependant, chez les patients atteints des premiers stades de maladie d'Alzheimer, force est de constater que c'est dans le locus coeruleus qu'apparaissent les premières inclusions argyrophiles de protéines Tau insolubles. De plus, il est décrit que ces neurones sont connectés vers les régions impactées par la suite de la pathologie.

IV.2.1.2. Les stades de Braaks I à VI

Dès 30 ans chez certains patients et jusqu'à 70 ans apparaissent les premiers NFT dans le cerveau. Ceux-ci sont localisés dans le locus coeruleus ainsi que dans le cortex transentorhinal. Ce stade est appelé stade de Braak I. Dans le stade de Braak II, le nombre de NFT dans le cortex transentorhinal augmente accompagné par quelques NFT dans le cortex entorhinal, le thalamus et dans la CA1.

Dans les stades III et IV, l'ensemble de l'hippocampe est touché et dans certaines régions de l'isocortex associatif des NFT commencent à apparaître. Les premiers signes de mort neuronale apparaissent au stade IV. A ce stade, les premiers signes légers de déclin

cognitifs apparaissent notamment avec des pertes mnésiques et des changements dans la personnalité.

A partir du stade V, la pathologie Tau a envahi quasiment tout le système nerveux central et notamment l'hypothalamus, tout l'isocortex, ainsi que le reste des aires corticales. Au stade VI, le nombre de NFT est encore plus important et la perte neuronale est massive notamment dans l'hippocampe et les régions affectées précocement. Le pre-subiculum est la dernière région affectée. Le diagnostic clinique initial de maladie d'Alzheimer est posé à ce stade là alors que la mort neuronale est déjà massive ce qui pose la question d'une intervention thérapeutique à ce moment là (Braak & Braak, 1991; Braak & Del Tredici, 2013). Ces stades ont été confirmés par d'autres études notamment en biochimie (Duyckaerts *et al*, 1997; Delacourte *et al*, 1999).

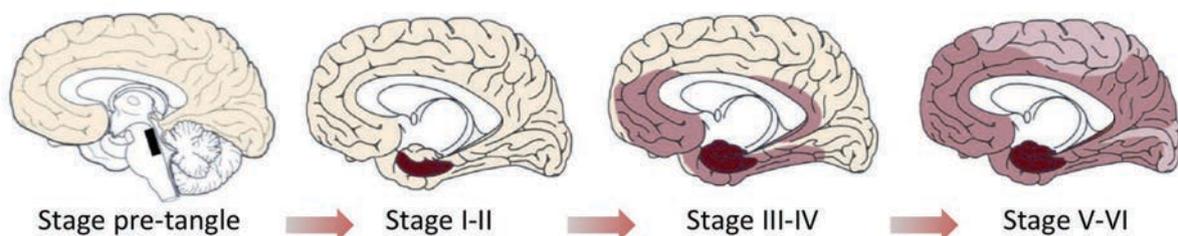


Figure 12 : Stades d'évolution de la pathologie Tau dans la MA. Distribution topographique des lésions Tau aux différents stades d'évolution de la pathologie Tau dans des schémas de cerveaux en vue médiale. Stade pre-tangle- la pathologie Tau commence dans le locus coeruleus symbolisé ici en noir. Stades I et II, les lésions Tau envahissent les régions entorhinales et transentorhinales. Stades III et IV- les lésions rejoignent les aires associatives du néocortex et finalement, dans les stades V et VI, les lésions Tau envahissent toutes les aires primaires et secondaires du néocortex. D'après (Braak & Del Tredici, 2013)

Figure 12: Staging of Tau pathology in AD. Topographic distribution of Tau lesions at the different stages of Tau pathology in schemes of brains in medial views. Pre-tangle stage: Tau pathology begins in the locus coeruleus (here in black). Stages I and II, Tau lesions invade entorhinal and transentorhinal regions. Stages III and IV: lesions involve the associative areas of the neocortex and finally during stages V and VI, Tau lesions invade all the primary and secondary neocortical areas. From (Braak & Del Tredici, 2013).

Dans la maladie d'Alzheimer, l'agrégation intracellulaire de protéines Tau est associée à l'agrégation extracellulaire d'un peptide appelé peptide beta-amyloïde ($A\beta$) en plaques séniles. Il est intéressant de noter que ce peptide se dépose lui aussi de façon hiérarchique et séquentielle en stades appelés stades de Thal mais que ces stades ne sont pas corrélés aux stades de Braak (Thal *et al*, 2002). De plus, certains auteurs ont démontré que le déclin cognitif des patients est corrélé à l'apparition de la DNF mais pas à celle des plaques amyloïdes (Arriagada *et al*, 1992; Baner *et al*, 1993; Duyckaerts *et al*, 1997; Delacourte *et al*, 1999).

IV.2.2. Evolution spatio-temporelle de la DNF dans la PSP (figure 13)

Outre la MA, une évolution spatio-temporelle des lésions Tau a aussi été montrée dans la PSP. Au contraire de la MA par contre, cette évolution est beaucoup moins décrite et donc beaucoup plus sujette à controverses. Une des premières études à avoir parlé de stades d'évolution de la pathologie dans la PSP est l'étude menée par Verny et collaborateurs qui ont

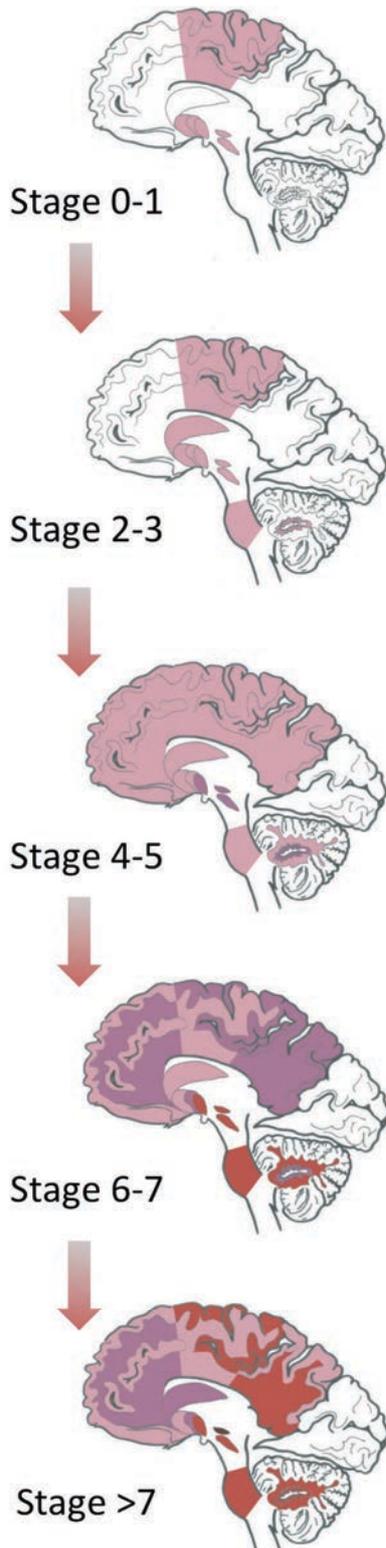


Figure 13 : Stades d'évolution de la pathologie Tau dans la PSP. Distribution topographique des lésions Tau aux différents stades d'évolution de la pathologie Tau dans des schémas de cerveaux en vue médiale. Stades 0-1- implication limitée au complexe pallido-luysio-nigral avec une implication faible du cortex prémoteur. Stades 2-3- la pathologie Tau atteint les ganglions de la base, le noyau pedonculo-pontin et le noyau dentelé. Stades 4-5- les lobes frontaux et temporaux sont touchés. Stades 6-7- Les atteintes du noyau sous-thalamique, de la substance noire, du globus pallidus interne, des aires néocorticales, du noyau pedonculopontin et des structures cérébelleuses sont de plus en plus sévères. Modifiée depuis (Williams *et al*, 2007)

Figure 13: Staging of Tau pathology in PSP. Topographical distribution of Tau lesions at the different neuropathological stages of PSP in schematic brain representations in medial views. Stages 0/1- Only the pallido-luysio-nigral complex is showing Tau pathology with weak involvement of premotor cortex. Stages 2/3- Tau pathology reaches basal ganglia, pedunculo-pontin nucleus and dentate nucleus. Stages 4/5- Frontal and temporal lobes are involved. Stages 6/7- Subthalamic nucleus, substantia nigra, internal globus pallidus, neocortical areas, pedunculo-pontin nucleus and cerebellum are more severely affected. Modified from (Williams *et al*, 2007)

montré que la pathologie Tau évolue très probablement depuis des structures sous-corticales jusqu'au gyrus pré-central et ainsi le cortex moteur primaire via le noyau pédonculopontin et éventuellement jusqu'à d'autres régions frontales (Verny *et al*, 1996). Dans une étude plus récente et sur un nombre de cas plus important, Williams et collaborateurs ont par ailleurs confirmé en partie ces données en montrant la présence de 7 stades définis. Dans les premiers stades, la pathologie Tau est présente de manière importante dans le système pallidus - noyau sous-thalamique - substance noire avec peu de pathologie Tau au sein du noyau pédonculopontin ainsi que dans le cortex pré-moteur. A partir du stade 2, les ganglions de la base sont touchés ainsi que le noyau dentelé. Lors des stades 4 et 5, en plus de l'augmentation de la sévérité dans les autres régions, les lobes pariétaux et frontaux sont touchés. Dans les stades 6-7, le cervelet ainsi que le putamen et le noyau caudé sont modérément affectés. Les régions néocorticales sont toutes touchées sauf le lobe temporal (Williams *et al*, 2007).

IV.2.3. Evolution spatio-temporelle de la démence à grains argyrophiles (figure 14)

De manière cohérente avec plusieurs autres études, Saito et collaborateurs ont déterminé des stades d'évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau dans l'AGD. En 2004, les auteurs ont ainsi réalisé une étude histologique post-mortem sur environ 1400 patients et ont décrit la présence de trois stades bien définis pour l'AGD. Dans le stade I, les grains argyrophiles ne sont présents que dans le gyrus ambiens ainsi qu'une partie de la CA1 dans certains cas. Dans le stade II, les grains argyrophiles rejoignent l'amygdale ainsi qu'une partie du cortex trans-entorhinal, du subiculum et du lobe temporal. La différence entre le stade II et le stade III réside dans la présence de grains argyrophiles dans le lobe frontal ainsi que dans la présence d'une dégénérescence importante du gyrus ambiens. Ainsi, dans le stade III, les grains argyrophiles peuvent être détectés dans le cortex insulaire, le gyrus cingulaire, le noyau accumbens, le septum ainsi que l'hypothalamus (Braak & Braak, 1998; Saito *et al*, 2002; 2004).

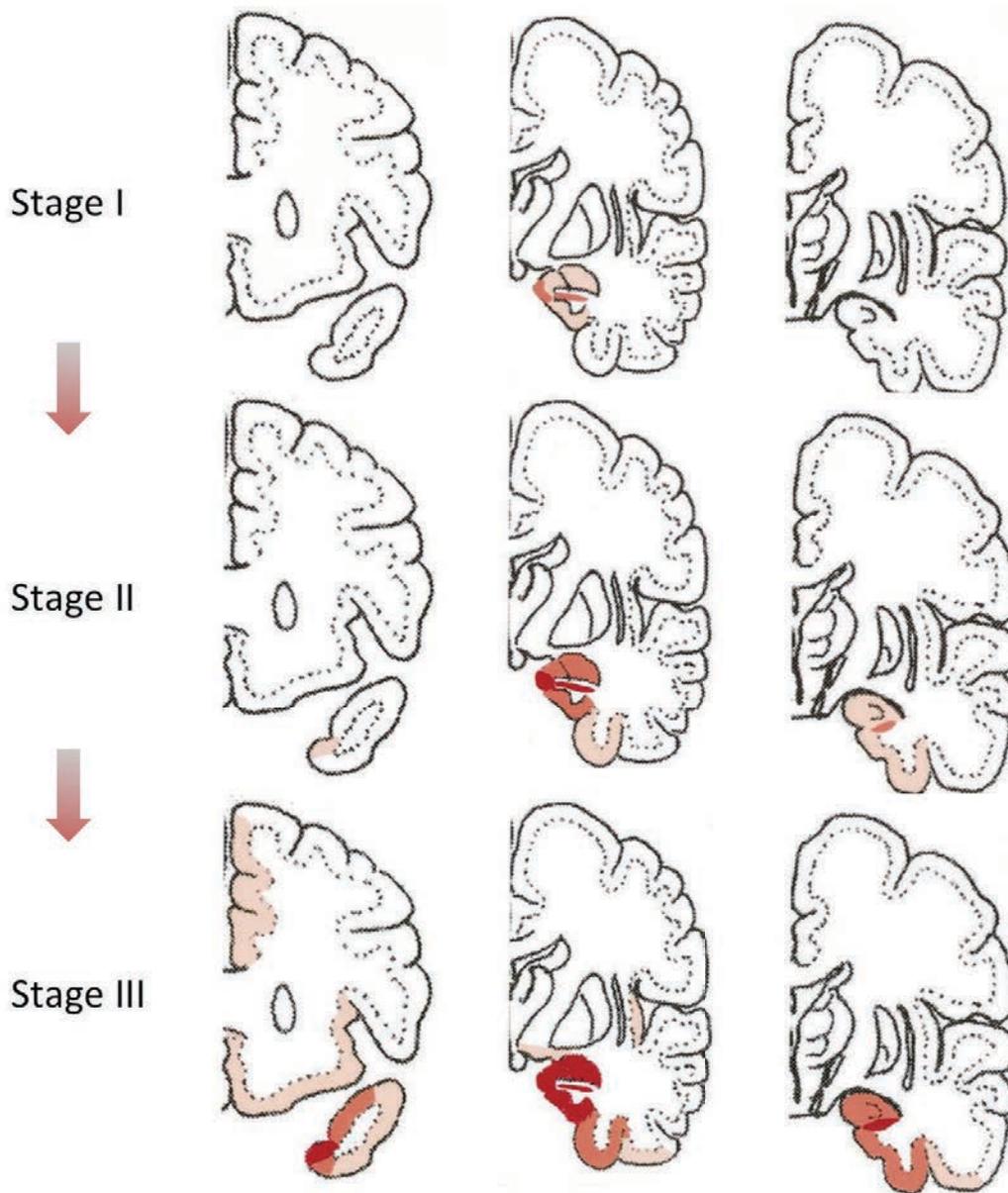


Figure 14 : Stades d'évolution de la pathologie Tau dans l'AGD. Distribution topographique des grains argyrophiles aux différents stades d'évolution de la pathologie Tau dans trois sections coronales. Stade I- les grains sont localisés dans le gyrus ambiens, la CA1 antérieure, l'aire entorhinale antérieure, et l'amygdale. Stade II, les grains sont plus apparents dans le lobe temporal médial, le subiculum postérieur et les cortex entorhinal et transentorhinal. Stade III- les grains rejoignent le gyrus cingulaire antérieur, le septum, le noyau accumbens, le gyrus rectus, le cortex insulaire et l'hypothalamus. Modifiée depuis (Saito *et al*, 2004)

Figure 14: Staging of Tau pathology in AGD. Topographical distribution of argyrophilic grains at the different stages of Tau pathology evolution in three coronal sections. Stage I- Argyrophilic grains are located in the ambiens gyrus, anterior CA1, anterior entorhinal area and amygdala. Stage II- medial temporal lobe is more affected with the involvement of posterior subiculum, entorhinal and transentorhinal cortices. Stage III- grains are invading the anterior cingulate gyrus, septum, accumbens nucleus, rectus gyrus, insular cortex and hypothalamus. Modified from (Saito *et al*, 2004)

Depuis les tauopathies sporadiques primaires comme l'AGD, jusqu'à des tauopathies causées par des défauts génétiques, les causes des tauopathies diffèrent et ne sont pas toujours connues. L'hétérogénéité entre tauopathies se ressent d'ailleurs jusque dans l'expression clinique des tauopathies. En effet, si les tauopathies sont toujours des maladies graves et invalidantes, elles peuvent présenter des tableaux cliniques allant des troubles moteurs jusqu'aux pertes mnésiques en passant par des troubles du comportement. Ces différences symptomatiques sont très certainement dues aux profondes disparités neuropathologiques observées que ce soit dans la composition des inclusions de Tau, leur morphologie mais surtout dans leur distribution au sein des structures neuroanatomiques. Ainsi, il est étonnant de constater que certaines tauopathies semblent assez localisées notamment dans les lobes fronto-temporaux alors que d'autres comme la MA évoluent progressivement jusqu'à envahir in fine quasiment tout le système cérébral des patients. Ces stades d'évolution décrits pour la MA, l'AGD et la PSP intriguent et posent la question des mécanismes qui mènent à cette évolution spatio-temporelle. Pourquoi la pathologie Tau envahit certaines régions et pas d'autres ? Y-a-t-il un « message » initiateur de la pathologie ? En suivant des modèles disponibles pour d'autres protéinopathies comme les maladies à prion ou les pathologies relatives à l'agrégation de l'A β (Jarrett & Lansbury, 1993; Meyer-Luehmann et al, 2006; Jucker & Walker, 2013), certains auteurs ont émis l'hypothèse que la pathologie Tau pourrait se propager par elle-même et que des espèces pathologiques de protéines Tau seraient capables de se propager activement de cellule en cellule et de région en région et de répandre ainsi la pathologie. Depuis 2009 et une étude élégante par Clavaguera et collaborateurs (Clavaguera et al, 2009), cette question de la propagation active de la pathologie Tau dans le système cérébral est beaucoup étudiée et est centrale dans cette thèse.

V. Chapter 3 summary : tauopathies, a heterogeneous group.

Although all tauopathies are characterized by aggregation of hyperphosphorylated Tau, tauopathies are heterogeneous in term of cause, morphology and composition of lesions, duration and affected brain regions inducing variable clinical symptoms.

Firstly, we can separate tauopathies in two distinct groups: (1) the sporadic diseases gathering the vast majority of tauopathies such as AD, progressive supranuclear palsy, Argyrophilic grain disease and Pick's disease (PiD), and (2) the tauopathies caused by genetic

alterations. The latter are rare diseases such as Down syndrome, myotonic dystrophy, type C Niemann-Pick disease, Danish or British familial dementia or cerebral amyloid angiopathy with prion protein (Ghetti *et al*, 1996). Also, fronto-temporal dementias with parkinsonism linked to chromosome 17 are particularly interesting because they are the only pathologies with autosomal dominant mutations of MAPT gene. Since 1998 and the first descriptions of mutations in MAPT gene, 53 mutations were described (figure 8, for review: Ghetti *et al*, 2015) mainly located in the microtubule binding region. These mutations lead to a reduced interaction between Tau and microtubules (Hasegawa *et al*, 1998; Hong *et al*, 1998; Barghorn *et al*, 2000; Rossi *et al*, 2012), structural modifications on Tau proteins (Barghorn *et al*, 2000; Frost *et al*, 2009b) and splicing deregulations (Hutton *et al*, 1998; D'Souza *et al*, 1999; D'Souza & Schellenberg, 2002). In addition, these mutations are inducing greater and quicker nucleation and fibrillogenesis (Barghorn *et al*, 2000; Chang *et al*, 2008). Therefore these mutations and particularly the mutations P301S and P301L were widely used for studying the pathological mechanisms of tauopathies, in particular in animal models because the formation of NFD is faster and more aggressive. Animal models of tauopathies are reviewed in annex (annexe 2; Dujardin *et al*, 2015).

Secondly, depending on tauopathies, the electrophoretic profiles of the Tau aggregates are variable. Indeed, the lesions are not composed of the same isoforms of Tau and 4 groups can be distinguished (figure 9, for review: Buée *et al*, 2000; Sergeant *et al*, 2008). In the first group, all the isoforms of Tau are aggregating like in AD (Goedert *et al*, 1992; Sergeant *et al*, 1997a; Buée & Delacourte, 1999; Hasegawa *et al*, 2014). In a second group of pathologies including corticobasal degeneration (CBD), AGD or PSP, only the 4R tau isoforms are aggregating (Sergeant *et al*, 1999; Tolnay *et al*, 2002; Buée & Delacourte, 1999). Contrarily, in Pick's disease and some precise FTDP-17, only 3R-Tau isoforms are present in aggregates (Sergeant *et al*, 1997b). Finally, in myotonic dystrophy, due to alternative splicing defects, only the 0N3R Tau isoform is aggregating (Sergeant *et al*, 2001; Muraige *et al*, 2005 ; figure 9).

In neurodegenerative diseases, the clinical symptoms are determined by the affected brain areas (figure 10). Thus, even the molecular pathologies are similar, the clinical symptoms may differ and we can retrieve three different groups within tauopathies: Alzheimer's dementias, frontotemporal dementias and parkinsonisms. In Alzheimer's type dementias, the massive neuronal death in hippocampus and temporal lobe leads to a crash of the cognitive functions and are characterized by amnesia, aphasia, agnosia, apraxia, and behavioural troubles (particularly apathy and aggressiveness). Additionally to AD, AGD or

primary age-related tauopathies are often characterized with Alzheimer's type dementia. The significant atrophy of fronto-temporal areas retrieved in the majority of tauopathies leads to the appearance of severe behavioural troubles in association with memory and language deficits. These behavioural troubles represent the principal diagnosis criteria with particularly disinhibition, apathy, loss of sympathy / empathy, compulsive behaviour, hyperorality and dysexecutive neuropsychologic profile (McKhann *et al*, 2001; Cairns *et al*, 2007; Rascovsky *et al*, 2011; Galimberti *et al*, 2015). This clinical profile is often observed in the patients with Pick's disease, fronto-temporal lobar degeneration, and also in most cases of FTDP-17 (figure 10G-H). Finally, the third clinical profile is parkinsonism characterized by movement disorders: akinesia, hypertonia, resting tremor. This profile is the consequence of troubles in basal ganglia like substantia nigra, premotor and motor cortex (figure 10E-F). These types of clinical features are often retrieved in PSP and CBD as well as parkinson dementia, parkinsonism dementia complex of Guam and post-encephalitic parkinsonism. We should emphasize that there are overlaps between these groups. For instance, a significant part of patients suffering from CBD have Alzheimer's type dementia (Boeve, 2011). Moreover, depending on mutations in FTDP-17, the clinical phenotype may vary (Ghetti *et al*, 2015). Therefore, to conclusively confirm a diagnosis, a neuropathological analysis is compulsory to highlight lesions, their morphologies, their compositions and their spatial distributions (Montine *et al*, 2012; Kovacs, 2015).

Morphologically, flame-shaped neurons with the somatodendritic part completely filled with insoluble Tau fibrils named neurofibrillary tangles (NFTs) can be evidenced in the majority of tauopathies and particularly in AD. NFTs are usually found in association with neuropil threads and dystrophic neurites (figure 11). Contrarily in pathologies like Pick's disease, Tau is accumulating into dense, spherical, perinuclear lesions known as Pick bodies. Contrarily, in PSP and CBD, glial lesions like astrocytic plaques, tufted astrocytes and oligodendroglial coiled bodies can be found (figure 11). Besides the morphologic differences, the regions affected by the lesions are also various. Indeed, in Pick's disease, Pick bodies are observed in frontal and temporal cortex as well as in granular cells of the dentate gyrus and of the hippocampus. Contrarily, CBD is characterized by an asymmetric focal atrophy of the cortex and striatum. In FTDP-17, consistently with variable clinical data, the morphology of lesions and the affected regions are variable. In general terms, Tau inclusions are abundant in the cerebral cortex, the white matter and subcortical nuclei. In some severe cases, the atrophy is present in several regions like fronto-temporal areas, hippocampus and hypothalamus (Ghetti *et al*, 2015). We will specify the neuropathological phenotype of mutations P301L and

P332S used in the following study. For P301L, massive neuronal and glial pathologies lead to the atrophy of frontal and temporal areas but also amygdala and substantia nigra (Bird *et al*, 1999). For the mutation P332S discovered in Lille (Deramecourt *et al*, 2012, annexe 3), large Pick body-like inclusions are present within the primary cortex, temporal lobe, the CA1 layer of the hippocampus and the dentate gyrus with profound atrophies of these regions (Deramecourt *et al*, 2012, annexe 3, figures 10 and 11). For CBD and FTDP-17, no spatiotemporal evolution of Tau pathology has been characterized (Williams, 2006; Kovacs, 2015). Contrarily, in three sporadic tauopathies: AD, PSP and AGD, Tau pathology evolves following precise, well-characterized and hierarchical stages (figures 12-13-14). The staging for AD was particularly characterized by Braak and co-workers on large cohorts of patients (2300 patients, for review: Braak & Del Tredici, 2011b; Braak *et al*, 2011; Braak & Del Tredici, 2013, figure 12). According to these studies, Tau pathology begins very early (around 10 to 30 years old) in the locus coeruleus at a stage named pre-tangle with neurons containing soluble hyperphosphorylated Tau proteins. Although it is unknown whether this stage is really predictive of AD and so remains very controversial, the first insoluble inclusions appear in this region and in the transentorhinal cortex from 30 to 70 years old in the brain of patients suffering from AD invading then the entorhinal cortex, thalamus and CA1. These stages are called Braak's stages I and II. Then, in stages III and IV, all the hippocampus is affected with the appearance of Tau pathology in the association isocortex. From stage V, Tau pathology invades almost all the CNS including hypothalamus and all the cortical areas. The clinical diagnosis is generally made during the stage VI that is characterized by massive neuronal death therefore one may ask the pertinence of therapeutic interventions at this stage (Braak & Braak, 1991; Braak & Del Tredici, 2013). It is interesting to note that in AD, the cognitive decline is more strongly correlated with the appearance of NFD than with beta amyloid plaques (Arriagada *et al*, 1992; Bancher *et al*, 1993; Duyckaerts *et al*, 1997; Delacourte *et al*, 1999).

For PSP, seven well-defined stages of Tau pathology evolution can be observed progressing from the system pallidus - subthalamic nucleus - substantia nigra to the pedunculopontine nucleus and premotor cortex. Then, the whole basal ganglia and dentate nucleus are affected. During stages 4 and 5, parietal and frontal areas are affected followed by slight affection of cerebellum, putamen and caudate nucleus. Neocortical regions are all affected excluding temporal areas (Verny *et al*, 1996; Williams *et al*, 2007 ; figure 13).

Saito and coworkers determined, in 2004, stages of evolution for AGD from the analysis of 1400 brains describing three stages. In stage I, the argyrophilic grains are present

in the ambiens gyrus, and also in the CA1 followed by affection of amygdala, transentorhinal cortex, subiculum and temporal lobe in stage II. In stage III, frontal lobe is affected in addition with a huge degeneration of ambiens gyrus (Braak & Braak, 1998; Saito *et al*, 2002; 2004 ; figure 14).

*Finally, from the causes, to the clinical symptoms, including the compositions or morphologies of Tau inclusions, but also their distributions in the neuroanatomical structures, a big heterogeneity is encountered in tauopathies. Thus, it is surprising that some tauopathies are very focal particularly in the fronto-temporal areas while others like AD are progressively invading all the CNS of patients. One may ask the mechanisms allowing such evolutions in AD, AGD and PSP. Why Tau pathology invades certain areas and not others? What causes the initiation of the pathology? Following data obtained for other proteinopathies (Jarrett & Lansbury, 1993; Meyer-Luehmann *et al*, 2006; Jucker & Walker, 2013), the hypothesis that Tau pathology could propagate by itself and that pathological species of Tau may actively propagate from cell-to-cell spreading the pathology has been raised.*

Chapitre 4 : La propagation de Tau

Décrits dès les années 90, les mécanismes d'évolution de la pathologie Tau dans le système cérébral sont longtemps restés incompris. Au fil des années et de la description des propriétés intrinsèques aux tauopathies, il a été découvert des similarités entre la pathologie Tau et d'autres protéinopathies. Ainsi, à l'instar d'autres protéines comme la synucléine, le prion ou le peptide amyloïde, la protéine Tau change de conformation en contexte pathologique et forme, de manière généralement sporadique, des inclusions filamenteuses très ordonnées et riches en feuillets bêta plissés. De plus, dans ces pathologies, une évolution spatio-temporelle stéréotypée peut généralement être identifiée comme pour la maladie de Parkinson (Braak *et al*, 2003) ainsi que les pathologies liées au peptide A β (Thal *et al*, 2002).

Plusieurs auteurs ont alors émis l'hypothèse que toutes ces pathologies pouvaient être rassemblées dans un groupe aux propriétés similaires et que ces protéines pourraient être considérées comme des protéines de type prion ou prionoïdes (Pour revue : Walker *et al*, 2006; Aguzzi & Rajendran, 2009; Frost & Diamond, 2010; Goedert *et al*, 2010; Hall & Patuto, 2012; Jucker & Walker, 2013; Clavaguera *et al*, 2013b).

I. Le club des protéines de type prion

I.1. Caractéristiques du prion

Les maladies à prion comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob sont des pathologies neurodégénératives rares et très agressives caractérisées par l'accumulation de protéines prion mal conformées. Ces pathologies ont très vite intéressé la communauté scientifique par un mode de transmission peu commun. Plusieurs évidences ont ainsi montré que les maladies à prion sont, dans certains cas, transmissibles d'individu à individu ainsi qu'entre espèces (Gibbs *et al*, 1968) suggérant l'existence d'un agent infectieux. En 1982, Prusiner et collaborateurs émettent l'hypothèse que cet agent est une protéine (Prusiner, 1982). Cette hypothèse a rapidement été confirmée par des recherches intensives montrant qu'une protéine prion mal conformée (PrP^{sc}) est responsable de la transmission de la pathologie (Pour revue : Prusiner, 1998; Aguzzi & Calella, 2009; Prusiner, 2013). En effet, il a été montré que les

protéines prion anormales PrP^{sc} sont capables de convertir les protéines prion normales (PrP^c) en PrP^{sc}. Ces PrP^{sc} se rassemblent ensuite et forment des oligomères solubles puis des fibres de type amyloïde (fibres insolubles très structurées en feuillets beta plissés parallèles). Le mécanisme de formation des fibres par recrutement de monomères par un oligomère de départ (le noyau) est appelé mécanisme de nucléation ou « seeding » (Voir Jucker & Walker, 2013, figure 4). De manière intéressante, différentes souches de prion existent formant des fibres de conformations dissemblables. Ces différences de conformations qui sont, elles aussi, transmissibles, semblent être dictées par la conformation du noyau de base (Telling *et al*, 1996). De plus, les protéines PrP^{sc} sont capables d'être transférées de cellule en cellule répandant ainsi la pathologie dans plusieurs régions cérébrales.

Ces caractéristiques ont mené certains auteurs à définir les maladies à prion comme des maladies infectieuses. Ce terme reste controversé et doit être mesuré au vu de la définition des maladies infectieuses qui sont des maladies provoquées par la transmission d'un microorganisme se répliquant dans son hôte. Il est donc difficile de considérer un peptide comme un agent infectieux. En effet, celui-ci n'est pas un agent externe à l'hôte et ne se réplique pas à proprement parler mais entraîne un changement de conformation de protéines endogènes (Liberski, 2014; Aguzzi & Calella, 2009).

I.2. Autres protéines de type prion

La protéine prion a été la première protéine pour laquelle ont été décrites ces propriétés pathologiques tout à fait surprenantes. Plus tard, il a été émis l'hypothèse que d'autres protéines appelées protéines de type prion ou prionoïdes pourraient partager ces caractéristiques. Ainsi, si l'on résume la littérature sur le sujet, on peut faire ressortir les caractéristiques suivantes pour intégrer une protéine au groupe des prionoïdes :

- La protéine doit être l'unité de transmission unique de la pathologie.
- Cette protéine doit être capable de convertir par elle-même une protéine endogène normale en une protéine mal-conformée.
- Il doit exister un mécanisme de « seeding » menant *in fine* à la formation de fibres amyloïdes.
- Les protéines mal-conformées doivent être transférées de cellule en cellule.
- Des souches différentes existent en terme de conformation mais aussi de comportement *in vivo*.

Il est important de noter que les protéines de type prion peuvent donc être présentes

sous différentes formes et espèces. Elles ne sont donc pas forcément fibrillaires et peuvent aussi être sous forme oligomérique ou tronquée tant qu'elles récapitulent les caractéristiques précédentes. Trois protéines majeures impliquées dans des pathologies neurodégénératives ont principalement été suspectées d'être des protéines de type prion : la synucléine, le peptide A β , et bien entendu la protéine Tau.

Pour le peptide amyloïde et la synucléine, il apparaît que les lésions sont transmissibles, notamment par un mécanisme de « seeding » qui peut être observé *in vitro* (Hu *et al*, 2009; Jarrett & Lansbury, 1993; Volpicelli-Daley *et al*, 2011). Ce mécanisme a également été décrit *in vivo* après une injection intracérébrale, chez le rongeur, de lysats cérébraux humains ou murins contenant des agrégats (Kane *et al*, 2000; Meyer-Luehmann *et al*, 2006; Morales *et al*, 2012; Desplats *et al*, 2009; Mougnot *et al*, 2012; Luk *et al*, 2012b). Il est à noter que la plupart du temps, les rongeurs utilisés comme hôtes surexpriment la protéine humaine. De manière intéressante, ces expériences fonctionnent aussi après injection de fibres synthétiques (Stöhr *et al*, 2012; Luk *et al*, 2012a). Morphologiquement, à l'instar du prion, plusieurs souches aux comportements physicochimiques et fonctionnels différents peuvent être observées pour ces deux protéines (Petkova *et al*, 2005; Yonetani *et al*, 2009; Bousset *et al*, 2013; Peelaerts *et al*, 2015).

Pour la synucléine et le peptide A β , les expériences *in vivo* précédemment décrites ont montré qu'après l'inoculation, les lésions pouvaient se propager de région en région (Hamaguchi *et al*, 2012; Luk *et al*, 2012b). Les mécanismes de propagation de ces lésions ne sont pas clairement identifiés mais il a été décrit que les agrégats de synucléine sont capables d'être transférés de cellule en cellule notamment dans des cultures primaires de neurones (Freundt *et al*, 2012; Volpicelli-Daley *et al*, 2011). De plus, il semble que le peptide A β ainsi que la synucléine soient sécrétés par la cellule notamment via de petites vésicules extracellulaires nommées exosomes, que nous définirons par après, et qui pourraient être impliqués dans les mécanismes de propagation des lésions (Lee *et al*, 2005; Rajendran *et al*, 2006; Emmanouilidou *et al*, 2010; Alvarez-Erviti *et al*, 2011).

En plus de ces deux protéines, de nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que la protéine Tau soit aussi une protéine de type prion.

II. Tau une protéine de type prion ?

Pour comprendre si la protéine Tau est une protéine de type prion, il convient de clarifier

certaines termes sémantiques. Ainsi, il faut différencier les termes suivants : 1) la propagation de la pathologie qui correspond à un transfert actif de la pathologie d'une région à une autre et qui n'implique pas forcément un mécanisme de type prion, 2) la propagation de la protéine qui n'implique pas forcément un mécanisme pathologique et 3) une propagation de type prion, qui implique les critères sus-cités dont le transfert de la protéine puis la conversion/recrutement par un mécanisme de 'seeding'. Par la suite, nous nous attèlerons à explorer ces différentes thématiques (propagation de la pathologie Tau, propagation/transfert de la protéine Tau, caractéristiques des prionoïdes) pour comprendre si la protéine Tau peut être considérée comme une protéine de type prion (Pour revues : (Hall & Patuto, 2012; Pooler *et al*, 2013b; Clavaguera *et al*, 2015)).

II.1. Transmissibilité et 'seeding' de la pathologie Tau ?

Le concept de « seeding » de la protéine Tau a été mis en évidence *in vitro* dès 1998 par Friedhoff et collaborateurs montrant que la protéine Tau était capable de polymériser en solution en présence soit de polyanions (e.g. l'héparine), soit d'une unité de nucléation (fibres fragmentées par sonication) (Friedhoff *et al*, 1998). Ce n'est qu'en 2009 que les premières évidences du 'seeding' ont été rapportées *in cellulo* (Frost *et al*, 2009a) ou *in vivo* (Clavaguera *et al*, 2009). Ces deux études ont apporté la preuve de concept que la pathologie Tau est transmissible via la protéine Tau et probablement grâce à un mécanisme de 'seeding'. Beaucoup d'études *in vivo* et *in vitro* ont dès lors confirmé et complété ces données.

II.1.1. Etudes *in vivo* (Pour revue voir Dujardin *et al*, 2015 en annexe 2)

Dans la première étude *in vivo*, Clavaguera et collaborateurs ont injecté des lysats cérébraux de souris surexprimant une protéine Tau humaine mutée P301S et développant de la DNF dans le cerveau de souris ALZ17 surexprimant une protéine Tau humaine sauvage mais ne développant pas de DNF. De manière intéressante, les auteurs ont été capables de montrer un développement de pathologie Tau dans les cerveaux des souris injectées. Il est à noter que quand l'extrait est immunodéplété de protéines Tau, aucune pathologie n'est détectée ce qui suggère qu'il s'agit bien de l'agent responsable de la transmission de la pathologie (Clavaguera *et al*, 2009 ; figure 15 panel B). Les études suivantes ont souvent repris le concept d'injections d'extraits cérébraux ou d'agrégats de Tau par voie

intracérébrale. Suivant leur première étude, Clavaguera et collaborateurs ont d'abord démontré cette transmissibilité en injectant des lysats de cerveaux humains atteints de MA mais aussi de PSP, AGD, CBD, tauopathie primaire liée à l'âge et maladie de Pick. Il est à noter que si toutes ces pathologies sont transmissibles, les morphologies des lésions après injection sont différentes (Clavaguera *et al*, 2013a). Dans plusieurs articles complémentaires, certains auteurs ont montré que l'injection, chez des souris P301S, de fibres synthétiques ou de lysats cérébraux similaires à ceux décrits par Clavaguera potentialisent la formation de pathologie Tau et entraînent des déficits cognitifs et synaptiques (Iba *et al*, 2013; Ahmed *et al*, 2014; Sanders *et al*, 2014; Peeraer *et al*, 2015; Stancu *et al*, 2015 ; figure 15 panel C). Similairement à ce qui est observé pour le prion, plusieurs études montrent que la transmissibilité des lésions ne s'arrête pas au premier animal mais peut être prolongée d'animaux en animaux lors d'injections en série (Clavaguera *et al*, 2013a; Sanders *et al*, 2014). Certaines de ces études suggèrent que les agrégats sont capables de recruter les protéines Tau endogènes et d'entraîner leur conversion vers une forme pathologique en montrant la présence de protéines Tau murines dans les agrégats néoformés (Clavaguera *et al*, 2009; Iba *et al*, 2013; de Calignon *et al*, 2012).

II.1.2. Etudes *in vitro*

In vitro, le principe de seeding est le même avec l'incubation de protéines fibrillaires synthétiques ou purifiées à partir de cerveaux humains sur des cellules exprimant la protéine Tau (Frost *et al*, 2009a; Nonaka *et al*, 2010; Guo & Lee, 2011; Santa-Maria *et al*, 2012; Holmes *et al*, 2014; Takahashi *et al*, 2015). Les études *in vitro* permettent d'étudier plus d'aspects mécanistiques que les études *in vivo* et notamment les propriétés des fibres. Ainsi, en parallèle des travaux de Clavaguera et collaborateurs, l'équipe du Dr Diamond a montré, en utilisant différentes lignées cellulaires, que des agrégats synthétiques de protéines Tau tronquées sont internalisés dans les cellules via la voie de l'endocytose. Les auteurs mettent ensuite en évidence un recrutement des protéines endogènes solubles par les fibres exogènes en microscopie confocale (Frost *et al*, 2009a). La plupart des auteurs mettent ainsi en évidence que les fibres rentrent difficilement dans les cellules et utilisent donc des méthodes comme la lipofection pour potentialiser leurs effets (Nonaka *et al*, 2010; Guo & Lee, 2011; Holmes *et al*, 2014). Les modèles cellulaires permettent également de tester plusieurs espèces de Tau notamment des protéines tronquées pour mettre en évidence que le domaine de liaison aux microtubules semble être d'un intérêt majeur pour les mécanismes de seeding (Guo &

Lee, 2011; Holmes *et al*, 2014). De plus, une étude récente suggère que le trimère de protéines Tau est l'unité minimale pour observer un phénomène de seeding (Mirbaha *et al*, 2015). En outre, il est intéressant de noter que la grande majorité des études, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* utilisent des isoformes 4R de la protéine Tau. Seuls Nonaka et collaborateurs montrent du seeding *in vitro* avec des espèces 3R (Nonaka *et al*, 2010).

In vitro et *in vivo*, la pathologie Tau est donc transmissible via un mécanisme de seeding (figure 15). Pour que la protéine Tau puisse être considérée comme une protéine de type prion, il faut que cette pathologie se propage de cellule en cellule dans le cerveau.

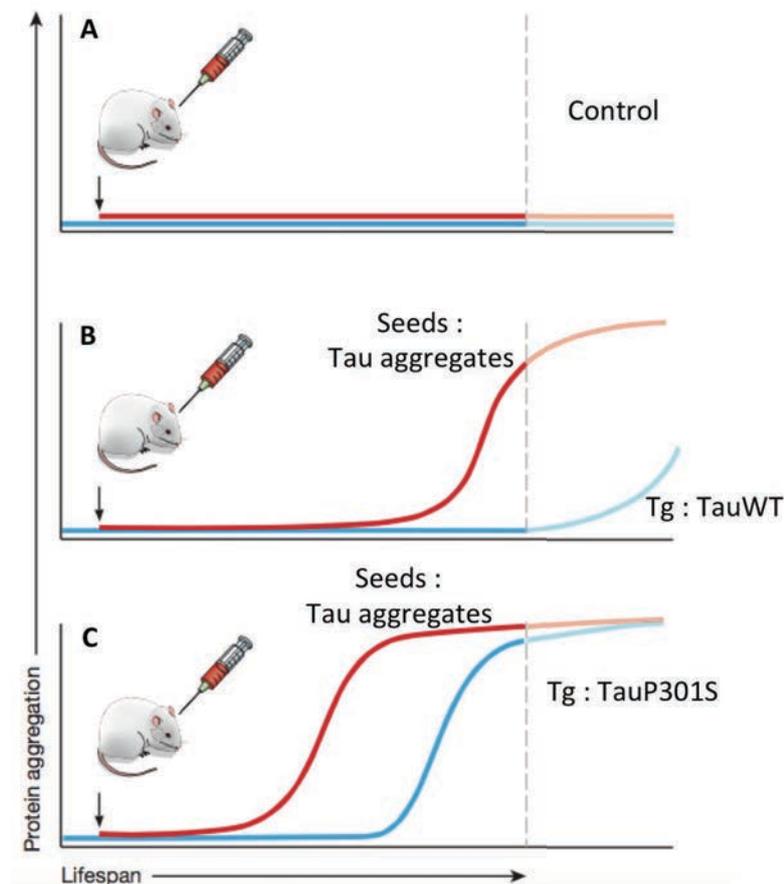


Figure 15 : Modèle de transmissibilité par seeding de la pathologie Tau chez la souris.

A- Une protéine endogène n'est pas amyloïdogénique

physiologiquement. Dans ce cas de figure, l'application d'un noyau ne va pas induire l'agrégation de protéines.

B- Une protéine amyloïdogénique comme la protéine Tau ne va pas s'agréger durant la vie de la souris dans des conditions normales (courbe bleue). Exemple : la souris ALZ17.

Si un noyau d'oligomères ou de fibres est apporté, l'agrégation est plus précoce et apparaît avant la fin de la vie de l'animal (Courbe rouge)

Exemple : injection de lysats cérébraux présentant des agrégats de protéine Tau.

C- Une protéine très amyloïdogénique finit par s'agréger durant la durée de vie de la souris (courbe bleue) Exemple : une protéine Tau mutée en P301S.

L'injection d'un noyau approprié avance l'apparition de cette agrégation

(courbe rouge) Exemple : injection de lysats cérébraux présentant des agrégats de protéine Tau. Modifiée depuis (Jucker & Walker, 2013)

Figure 15: Model of Tau pathology transmissibility mediated by a « seeding » mechanism in mice.

A- An endogenous protein is physiologically non amyloidogenic. In that case, the injection of a nucleus does not induce protein aggregation.

B- An amyloidogenic protein like Tau protein is not aggregating during the mouse lifespan in normal conditions (blue curve, e.g. ALZ17 transgenic mice). If a nucleus of oligomers or fibers is injected, the aggregation is more precocious and appears before the end of the mouse life time (red curve, e.g. injection of cerebral lysates with Tau aggregates).

C- A strong amyloidogenic protein is aggregating during the mouse lifetime (blue curve, e.g. Tau proteins mutated in P301S). The injection of a suitable nucleus advances the appearance of the pathology (red curve, e.g. injection of cerebral lysates with Tau aggregates). Modified from (Jucker & Walker, 2013)

II.2. Propagation de la pathologie Tau / propagation de la protéine Tau

La propagation de la pathologie revêt plusieurs volets : est-ce que la pathologie se propage de cellule en cellule ? A-t-on un véritable transfert de la protéine Tau ? Quels sont les mécanismes d'entrée et de sortie des protéines Tau dans les cellules ?

II.2.1. Transfert de la pathologie

Dans la plupart des modèles sus-cités, les auteurs analysent la « propagation » de la pathologie Tau, c'est-à-dire son transfert de cellule en cellule *in vitro* ou de région en région *in vivo*. Ainsi dans des modèles cellulaires, l'équipe du Dr Diamond a mis en évidence le transfert d'agrégats de protéines Tau tronquées de cellule en cellule entraînant le seeding de la pathologie dans les cellules secondaires. (Frost *et al*, 2009a; Kfoury *et al*, 2012). En utilisant un système de culture primaire en chambre microfluidique, une autre étude montre le transfert d'agrégats de protéines Tau tronquées de neurone en neurone depuis l'axone jusqu'au soma de cellules secondaires (Calafate *et al*, 2015). Ce modèle montre, en outre, que stimuler ou inhiber la synapse favorise ou diminue respectivement la propagation de la pathologie ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de propagation trans-synaptique de la pathologie au sein de réseaux neuronaux particuliers. Cette hypothèse est renforcée par des études d'injections de lysats ou de protéines fibrillaires synthétiques *in vivo*, qui décrivent souvent une évolution spatio-temporelle de la pathologie depuis le site d'injection jusqu'à des zones connectées au site d'injection (Clavaguera *et al*, 2009; Iba *et al*, 2013; Ahmed *et al*, 2014; Stancu *et al*, 2015). Cependant, il semble que dans ce type de modèles, personne n'ait déterminé la zone de diffusion de l'injection de départ et donc il est difficile de déterminer si la propagation de la pathologie est réellement due à une propagation active des protéines Tau. Pour étayer l'hypothèse de la propagation de la pathologie Tau dans le système cérébral, d'autres modèles animaux ont donc été développés. Deux équipes indépendantes ont ainsi mis au point un modèle transgénique utilisant le promoteur neuropsine. Ce promoteur a permis la surexpression d'une protéine Tau humaine mutée en P301L spécifiquement dans le cortex entorhinal et d'observer la propagation de la pathologie Tau dans l'hippocampe (de Calignon *et al*, 2012; Liu *et al*, 2012). Ces derniers travaux montrent de manière convaincante la propagation de la pathologie Tau de proche en proche même si certaines données récentes indiquent que le modèle présente des fuites du transgène vers l'hippocampe (Yetman *et al*,

2015). Ces dernières données ne remettent pas en cause la validité de ces études mais les rendent plus difficiles à interpréter notamment sur les mécanismes de propagation.

II.2.2. Transfert de la protéine Tau

Le transfert de la pathologie n'est pas forcément le reflet d'un transfert de la protéine car il est possible d'imaginer d'autres mécanismes tels que l'activation de certains récepteurs qui entraînerait l'agrégation intracellulaire de la protéine Tau. Certaines études ont donc tenté de déterminer si la protéine Tau est capable de passer de cellule en cellule. *In cellulo*, les données à notre disposition semblent confirmer de manière concluante cette hypothèse. En effet, plusieurs études montrent un transfert d'agrégats de protéines Tau soit mutées soit tronquées de cellule en cellule. Ce transfert est effectif via le milieu de culture et peut être bloqué en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine Tau (Frost *et al*, 2009a; Kfoury *et al*, 2012; Yanamandra *et al*, 2013). *In vivo*, les évidences manquent excepté dans un modèle original de lamproie consistant en une microinjection de plasmides codant pour la protéine Tau dans des neurones géants bulbaires entraînant le transfert de la protéine d'un neurone à un autre (Kim *et al*, 2010b; Lee *et al*, 2012).

II.2.3. Mécanismes d'entrée et de sortie de la protéine Tau dans la cellule

L'idée du transfert de la protéine Tau de cellule en cellule implique un mécanisme de passage de la protéine Tau. La protéine Tau étant une protéine cytosolique, sa sécrétion via la voie de l'exocytose conventionnelle impliquant l'appareil de Golgi paraît difficilement envisageable. Dès lors, plusieurs études se sont intéressées à des voies de sécrétion différentes et notamment à l'implication de vésicules extracellulaires particulières nommées exosomes. Durant l'endocytose, l'invagination de la membrane plasmique entraîne la formation de l'endosome primaire. Cette membrane subit une autre invagination formant des vésicules intraluminales et donnant à l'endosome une apparence multivésiculaire. Durant cette étape, ces vésicules intraluminales encapsulent du matériel cytoplasmique. Ces corps multivésiculaires fusionnent ensuite avec la membrane plasmique et relarguent les vésicules intraluminales appelées exosomes et ayant une composition membranaire similaire à celle de la membrane plasmique. Les exosomes ont été largement décrits et caractérisés et leurs biogenèses semblent être très régulées par la cellule (figure 16, Pour revue : Kowal *et al*, 2014; Rajendran *et al*, 2014). Les exosomes sont d'un intérêt certain pour la recherche sur les

maladies neurodégénératives notamment depuis qu'il a été démontré qu'ils convoient le prion (Fevrier *et al*, 2004), le peptide A β (Rajendran *et al*, 2006), ainsi que la synucléine (Lee *et al*, 2005; Alvarez-Erviti *et al*, 2011). De plus, il a été montré que les exosomes convoient des lipides qui potentialisent la fibrillogénèse et accélèrent la formation de structures amyloïdes (Yuyama *et al*, 2008). Dans le cadre des Tauopathies, l'implication des exosomes reste controversée. En effet, certains auteurs décrivent la présence de la protéine Tau dans des exosomes purifiés à partir de milieu de cultures cellulaires non-neuronales surexprimant la protéine Tau (Saman *et al*, 2012; Simón *et al*, 2012b). D'autres auteurs n'ont par contre pas réussi à reproduire ces résultats dans d'autres modèles et sont donc plus circonspects quant à l'implication des exosomes dans le transfert de la protéine Tau (Fauré *et al*, 2006; Santa-Maria *et al*, 2012; Karch *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015). Ainsi de nombreuses études montrent qu'en absence de cytotoxicité, la protéine Tau est présente en majorité libre dans le milieu et non associée à des vésicules extracellulaires sans que le mécanisme de sortie de Tau ne soit élucidé : exocytose, propriétés fusogéniques ? Une étude récente suggère qu'en cas de surexpression, la kinase mTor entraîne, par un mécanisme inconnu, une relocalisation de la protéine Tau au sein de vésicules autophagiques ainsi que dans la voie réticulum endoplasmique-appareil de Golgi, ce qui pourrait suggérer l'existence d'un mécanisme d'exocytose de la protéine Tau (Tang *et al*, 2015 ; figure 16). La présence de protéine Tau libre dans le milieu extracellulaire est également stimulée par l'activité neuronale (Pooler *et al*, 2013a; Yamada *et al*, 2014). De manière particulièrement intéressante, il semble que les protéines Tau extracellulaires soient en grande majorité déphosphorylées et probablement tronquées dans leur partie carboxyterminale (Plouffe *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Mohamed *et al*, 2014). La troncation des protéines Tau sécrétée n'est cependant pas retrouvée dans tous les modèles et reste donc controversée (Chai *et al*, 2012).

Les mécanismes décrits ci-dessus sur la sécrétion de la protéine Tau ont été identifiés en grande majorité dans des modèles de culture cellulaire. Ces modèles représentent certainement plus une sécrétion physiologique qu'un réel processus pathologique comme suggéré par certains auteurs (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a). En effet, il est fort probable que ces processus de sécrétion interviennent dans la propagation de la pathologie mais il n'y a, à l'heure actuelle, aucune évidence définitive permettant de l'affirmer, autant pour les exosomes que pour la Tau libre. La pathologie semble d'ailleurs plus induire une diminution de la sécrétion de la protéine Tau comme suggéré par une étude de microdialyse chez des souris P301S (Yamada *et al*, 2011).

Les études sur la sécrétion de Tau ont donc montré la sécrétion de protéines Tau libres par les cellules ainsi que la sécrétion dans certaines conditions via les exosomes. Aucun lien entre ces mécanismes et l'évolution de la pathologie n'a par contre été établi et il n'est pas exclu que d'autres moyens de transfert tels que les nanotubes comme montré pour le prion (Gousset *et al*, 2009) ou d'autres types de vésicules extracellulaires ne soient impliqués (figure 16).

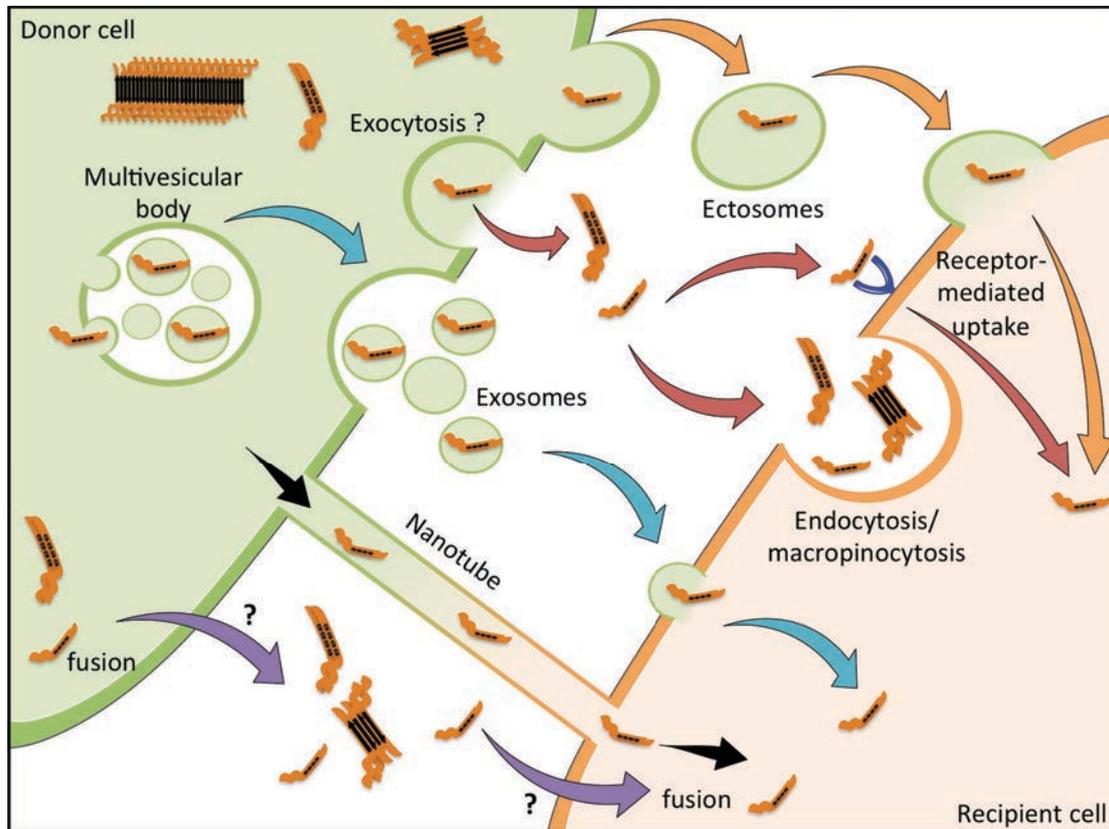


Figure 16 : Différents mécanismes pouvant expliquer le transfert de la protéine Tau d'un neurone à un autre. Violet- La protéine Tau pourrait avoir des propriétés fusogéniques et traverser la membrane plasmique directement depuis l'intérieur de la cellule jusqu'à l'espace intercellulaire et jusqu'à l'intérieur de la cellule receveuse **Noir-** La protéine Tau est susceptible de passer d'une cellule à une autre via des nanotubes, des structures membranaires riches en actine et dépourvues de tubuline qui se forment entre deux cellules provoquant des échanges cytoplasmiques et de membranaires. **Bleu-** La protéine Tau pourrait transiter via des exosomes. Ces petites vésicules extracellulaires (50-100nm de diamètre) sont issues de l'invagination de la membrane de l'endosome menant à la formation du corps multivésiculaire. Celui-ci, s'il fusionne avec la membrane plasmique, relargue les exosomes. Ces exosomes peuvent ensuite soit fusionner avec la membrane de la cellule secondaire, soit être internalisés via endocytose. **Rouge-** Les protéines Tau sont susceptibles également d'être sécrétées par un mécanisme d'exocytose et d'être internalisées dans le neurone secondaire par endocytose et plus particulièrement par macropinocytose. **Orange-** Les protéines Tau sont également susceptibles d'être présentes dans des vésicules extracellulaires nommées ectosomes (100 à 1000 nm de diamètre) issues d'un bourgeonnement direct de la membrane plasmique.

Figure 16: Different mechanisms that could explain the transfer of Tau protein from neuron-to-neuron. Violet- Tau protein could have fusogenic properties and could cross the plasma membrane directly from the inner cell to the extracellular space and finally to the receiving cell. **Black-** Tau protein may move from cell-to-cell via nanotubes, membranous actin-rich and tubulin-devoided structures that form between two cells inducing cytoplasmic and membrane →

←exchanges. **Blue-** Tau protein could be carried by exosomes. Exosomes are small extracellular vesicles (diameter : 50-100 nm) coming from the invagination of the endosomal membrane leading to the formation of the multivesicular body. After fusion of the multivesicular body with the plasma membrane, exosomes are released. Exosomes are then fused with the plasma membrane of secondary cells or internalized by endocytosis. **Red-** Tau proteins could also be secreted by exocytosis and be internalized in the secondary neuron by an endocytosis mechanism, particularly macropinocytosis. **Orange-** Tau proteins could be carried by extracellular vesicles named ectosomes (diameter : 100-1000 nm) coming from a direct budding from the plasma membrane.

En parallèle des études sur les mécanismes de seeding *in cellulo*, plusieurs études ont testé les moyens d'internalisation des protéines Tau fibrillaires par la cellule. D'après plusieurs auteurs, les protéines Tau fibrillaires seraient internalisées via un mécanisme d'endocytose et particulièrement de macropinocytose (Frost *et al*, 2009a; Holmes *et al*, 2013; Wu *et al*, 2013) en utilisant des héparanes sulfate protéoglycanes comme récepteurs (Holmes *et al*, 2013 ; figure 16). Les héparanes sulfate protéoglycanes sont impliqués dans énormément de processus cellulaires et sont généralement associés à d'autres récepteurs. Il n'est donc pas exclu qu'un autre type de récepteur plus spécifique de l'internalisation des protéines Tau soit identifié dans les prochaines années. Ces travaux ont été réalisés à partir de protéines Tau fibrillaires. Pour la protéine Tau monomériques, plusieurs études s'opposent, certaines montrant que celle-ci n'est pas internalisée (Mirbaha *et al*, 2015) et d'autres affirmant le contraire (Falcon *et al*, 2015).

II.2.4. Les espèces propagatives de Tau.

La protéine Tau existe sous différentes formes. Garde-t-elle les mêmes propriétés en terme de propagation/sécrétion/transfert qu'elle soit tronquée, phosphorylée, monomérique, oligomérique, agrégée ou encore sous différentes isoformes ? Les résultats actuels sont assez partiels sur ce sujet mais suggèrent que les protéines Tau sécrétées sont majoritairement déphosphorylées (Plouffe *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Mohamed *et al*, 2014). Il est intéressant de noter que les protéines Tau associées à la membrane plasmique sont elles aussi déphosphorylées même si certains auteurs proposent que les protéines Tau extracellulaires soient déphosphorylées par une alcaline phosphatase en extracellulaire (Díaz-Hernández *et al*, 2010).

L'état de protéolyse des protéines Tau sécrétées est plus controversé. Différentes formes de Tau sont ainsi obtenues dans différentes études. Ainsi des formes tronquées de protéines Tau sont obtenues dans des milieux de culture cellulaire ou dans du LCR provenant de modèles murin transgéniques de tauopathies (Kim *et al*, 2010a; Plouffe *et al*, 2012) ainsi

que dans du LCR humain (Saman *et al*, 2012; Borroni *et al*, 2009; Hanisch *et al*, 2010). Cependant, il a aussi été mis en évidence des formes entières de protéines Tau sécrétées dans des milieux de culture cellulaire (Chai *et al*, 2012; Karch *et al*, 2012), du fluide interstitiel cérébral murin (Yamada *et al*, 2011), et du LCR humain (Hanisch *et al*, 2010). Le profil des protéines Tau dans le LCR est cependant une information à relativiser compte tenu du fait qu'il n'est pas sûr que les protéines Tau dans le LCR soient le reflet de la sécrétion par la cellule. En effet, il est probable que les protéines soient modifiées pendant leur parcours jusqu'au LCR, et que les proportions des différentes espèces protéolytiques ou non soient modifiées.

Le groupe de recherche piloté par le Dr Kaye a lui identifié la formation d'espèces oligomériques très précoces qui seraient présentes avant l'hyperphosphorylation (notamment de l'épitope AT8) et qui sont capables de déclencher un « seeding » de la pathologie (Lasagna-Reeves *et al*, 2012a; 2012b). Ces données sont cohérentes avec les données du Dr Diamond montrant que le trimère de Tau est l'unité minimale de seeding (Mirbaha *et al*, 2015) et que le « seeding » est une propriété précoce de la protéine Tau qui arrive avant l'hyperphosphorylation AT8 et avant l'apparition de méplielement MC1 (Holmes *et al*, 2014). L'étude de Lasagna-Reeves décrit aussi que la pathologie Tau est plus étendue quand des oligomères, plutôt que des PHF, sont injectés *in vivo* suggérant que les oligomères sont des espèces plus propagatives que les fibres (Lasagna-Reeves *et al*, 2012a). En utilisant le modèle de propagation publié en 2012 (de Calignon *et al*, 2012), une étude récente apporte des données allant dans ce sens en montrant que la propagation de la pathologie se fait via des espèces solubles (Polydoro *et al*, 2014).

Si l'on considère que la protéine Tau est de type prion, il est intéressant de remarquer que ces espèces qui se propagent plus ou moins bien de cellule à cellule peuvent se rapprocher de véritables souches. Ainsi, il serait d'un intérêt majeur de tester si ces espèces propagatives peuvent impliquer un phénomène de 'seeding'.

II.3. Peut-on parler de souches concernant les fibres de protéines Tau ?

A l'instar du prion, plusieurs études ont montré que les fibres de Tau pouvaient avoir des morphologies différentes. En effet, confirmant une étude plus ancienne, Frost et collaborateurs ont ainsi déterminé que les fibres de protéines Tau sauvages ont une morphologie différente de fibres de protéines Tau mutées en P301L/V337M. Il est à noter que cette conformation est dépendante du noyau de départ. Ainsi, quand un noyau de protéines

Tau mutées est ajouté à des protéines Tau sauvages, les fibres ont la conformation des protéines mutées (Aoyagi *et al*, 2007; Frost *et al*, 2009b). Ces données ont été confirmées récemment dans un modèle cellulaire montrant la présence de plusieurs souches et également que la conformation fibrillaire détermine la nature du seeding (Falcon *et al*, 2015). Par ailleurs, plusieurs études se sont intéressées aux différences de seeding entre isoformes. Ainsi, les isoformes de Tau semblent aussi être à l'origine de différences au niveau des propriétés et de la morphologie des fibres (Adams *et al*, 2010; Furukawa *et al*, 2011). Nonaka et collaborateurs montrent également que le seeding de Tau est dépendant des isoformes et que les espèces 3R s'agrègent mieux autour d'un noyau 3R et que les espèces 4R s'agrègent mieux autour d'un noyau 4R (Nonaka *et al*, 2010). De même, une étude a comparé l'étendue de la pathologie dans deux lignées de rats surexprimant une protéine Tau tronquée soit 3R soit 4R montrant que la pathologie est plus étendue chez les rats 4R (Levarska *et al*, 2013). Ces données sont donc conformes avec l'existence de souches de protéines Tau. Ces souches pourraient expliquer les morphologies différentes de lésions observées dans les pathologies humaines et transmissibles à des modèles murins ou cellulaires (Clavaguera *et al*, 2013a; Sanders *et al*, 2014). Ces souches pourraient aussi expliquer les différentes évolutions spatio-temporelles et les différents isoformes s'agrégeant dans les lésions.

En conclusion, la protéine Tau a des points communs certains avec le prion. En effet, quand la protéine Tau s'agrège, elle forme des fibres de type amyloïde. Ces fibres sont capables de transmettre la pathologie via un mécanisme de « seeding » en recrutant des protéines Tau endogènes normales. Il y a peu de travaux montrant une réelle conversion conformationnelle des protéines Tau mais elle est probable au vu de la structure finale très ordonnée des fibres qui détonne avec le manque de structuration de la protéine Tau en solution. Les fibres de protéines Tau ont aussi des particularités morphologiques et physico-chimiques qui mènent à penser qu'il existe réellement des souches de protéines Tau. Enfin, la protéine Tau est capable de passer de cellule en cellule probablement via des mécanismes de sécrétion ce qui pourrait expliquer la propagation de la pathologie dans le système cérébral. Cependant, il semble qu'il y ait une réelle propagation physiologique de la protéine Tau qu'il faut probablement dissocier de la pathologie. Ainsi, aucune étude ne permet à ce jour d'incriminer un quelconque moyen de sécrétion ou d'internalisation impliqué dans la pathologie. Plusieurs études montrent ainsi le transfert de la protéine Tau ainsi que sa sécrétion via divers mécanismes mais personne ne montre de manière concluante que les espèces transférées sont capables d'enclencher un mécanisme de « seeding ». Enfin, il est important de souligner que l'analyse des études sur la propagation de la protéine Tau ainsi

que sur ses propriétés de type prion se heurte à la pertinence des modèles d'étude. En effet, dans la plupart des études, des formes pro-agrégatives de protéines Tau sont utilisées comme des formes tronquées synthétiques ou des formes mutées. Même si ces formes sont d'un intérêt majeur notamment dans l'étude des mécanismes d'agrégation de la protéine Tau, il a été clairement démontré que les protéines Tau mutées notamment sont des souches à part entière avec des comportements différents de la protéine Tau sauvage. De plus, il est à rappeler que les tauopathies dans lesquelles une progression spatio-temporelle de la pathologie a été décrite comme la MA, l'AGD, et la PSP sont toutes sporadiques. Pour valider les données de la littérature sur la propagation de la pathologie Tau, il convient donc de les vérifier sur des modèles de Tauopathies sporadiques.

III. Chapter 4 summary: Tau propagation

Over time, similarities between Tau pathology and other proteinopathies were discovered leading to the hypothesis that all these pathologies could be gathered and that all these proteins could be considered as prion-like protein or prionoids (for review: (Walker *et al*, 2006; Aguzzi & Rajendran, 2009; Frost & Diamond, 2010; Goedert *et al*, 2010; Hall & Patuto, 2012; Jucker & Walker, 2013; Clavaguera *et al*, 2013b)).

Prion diseases are rare neurodegenerative pathologies characterized by the accumulation of misfolded prion proteins. In 1982, Prusiner and collaborators ventured the hypothesis that the protein prion itself would be an infectious agent, and the unique responsible of the pathology spreading in the body and between individuals (Prusiner, 1982). This hypothesis was rapidly confirmed, even if the term “infectious” is still controversial (Liberski, 2014), showing that abnormal prion proteins are able to convert normal prion proteins into the pathological form. The latter form soluble oligomers and consequently amyloid fibers. The mechanism of formation of the fibers by recruitment of monomers by an initial oligomer (or nucleus) is called seeding (See Jucker & Walker, 2013, figure 4). Interestingly, different strains of prion exist with dissimilar fibers conformations that are transmissible (Telling *et al*, 1996). Moreover, the pathological prions can be transferred from cell-to-cell, spreading the pathology in several brain areas.

This was the first description of a protein with such pathological properties but recently, the hypothesis that other proteins like the amyloid peptide (A β), the alpha synuclein and Tau could share these properties has been raised. For the amyloid peptide and the

synuclein, the lesions are transmissible by a seeding mechanism (Hu *et al*, 2009; Jarrett & Lansbury, 1993; Volpicelli-Daley *et al*, 2011; Kane *et al*, 2000; Meyer-Luehmann *et al*, 2006; Morales *et al*, 2012; Desplats *et al*, 2009; Mougnot *et al*, 2012; Luk *et al*, 2012b; Stöhr *et al*, 2012; Luk *et al*, 2012a). Similarly to the prion, different strains with different functional and physicochemical properties seem to co-exist (Petkova *et al*, 2005; Yonetani *et al*, 2009; Bousset *et al*, 2013; Peelaerts *et al*, 2015). Lesions also appeared for these two pathological proteins to actively propagate in the brain (Hamaguchi *et al*, 2012; Luk *et al*, 2012b). Although the mechanisms of propagation are not clearly understood, it was described that the aggregates of synuclein were cell-to-cell transferred particularly in primary neurons (Freundt *et al*, 2012; Volpicelli-Daley *et al*, 2011). Moreover, A β and synuclein are secreted by cells particularly via small extracellular vesicles named exosomes and that could be implicated in the propagation processes (Lee *et al*, 2005; Rajendran *et al*, 2006; Emmanouilidou *et al*, 2010; Alvarez-Erviti *et al*, 2011).

In order to understand if Tau protein is a prion-like protein (for review: Hall & Patuto, 2012; Pooler *et al*, 2013b; Clavaguera *et al*, 2015), it is important to differentiate the following terms: 1) propagation of the pathology corresponding to an active region-to-region transfer of the pathology which does not necessarily imply a prion-like mechanism, 2) propagation of the protein which does not necessarily imply a pathological mechanism and 3) prion-like propagation which implicates a transfer of the protein and a conversion/recruitment by seeding.

Several studies have investigated the transmissibility and seeding of Tau pathology confirming this concept *in vitro* (Friedhoff *et al*, 1998), *in cellulo* (Frost *et al*, 2009a) or *in vivo* (Clavaguera *et al*, 2009). After these three studies, many have confirmed and reproduced this data. These studies are summarized in annex (annexe 2; Dujardin *et al*, 2015). Briefly, Clavaguera and coworkers showed that injecting Tau aggregates extracted from mice overexpressing mutated Tau to mice overexpressing wild-type Tau was sufficient to induce Tau pathology (Clavaguera *et al*, 2009 ; figure 15 panel B). It is interesting to note that when a Tau-immunodepleted extract is injected, no pathology can be detected showing that Tau is the responsible factor. The same group has also showed similar results injecting human brain lysates of several tauopathies and reproducing the morphology of the lesions seen in the human disease (Clavaguera *et al*, 2013a). Many following studies have shown injections of cerebral lysates or synthetic fibers in P301S mice, potentiating the transmissibility (Iba *et al*, 2013; Ahmed *et al*, 2014; Sanders *et al*, 2014; Peeraer *et al*, 2015; Stancu *et al*, 2015 ; figure 15 panel C). Several of these studies show the presence of murine Tau in the aggregates,

suggesting that aggregates are able to recruit endogenous Tau proteins converting them to a pathological form (Clavaguera *et al*, 2009; Iba *et al*, 2013; de Calignon *et al*, 2012)

In parallel with data on animal models, *in vitro* several authors showed that after the incubation of aggregates, these were hardly internalized by endocytosis and were able to promote aggregation of overexpressed Tau in cell lines (Frost *et al*, 2009a; Nonaka *et al*, 2010; Guo & Lee, 2011; Santa-Maria *et al*, 2012; Holmes *et al*, 2014; Takahashi *et al*, 2015). These studies showed, using truncated Tau species, that the microtubule-binding domain is necessary to promote aggregation. Furthermore, Tau trimer is the minimal oligomer with which a seeding mechanism could be observed (Mirbaha *et al*, 2015). The vast majority of these studies are using 4R-Tau, only Nonaka and collaborators are showing seeding with 3R species (Nonaka *et al*, 2010).

Most of the models cited above analysed the propagation of Tau pathology looking for cell-to-cell transfer of Tau pathology. In cellular models, aggregated truncated Tau proteins seem to transfer in secondary cells (Frost *et al*, 2009a; Kfoury *et al*, 2012; Calafate *et al*, 2015). Calatafe and coworkers also suggest in their model that Tau is trans-synaptically transferred (Calafate *et al*, 2015). This hypothesis was also suggested in the models *in vivo* in which the Tau pathology evolves from the injection site to close connected areas (Clavaguera *et al*, 2009; Iba *et al*, 2013; Ahmed *et al*, 2014; Stancu *et al*, 2015). However, nobody checked the diffusion area of the injection in these models and it is therefore difficult to determine whether the propagation is an active process. In order to answer this question, two independent teams developed a transgenic model using the neuropsin promoter allowing for the overexpression of mutated Tau specifically in the entorhinal cortex and convincingly showing the propagation of the pathology in the hippocampus (de Calignon *et al*, 2012; Liu *et al*, 2012).

As the transfer of Tau pathology is not necessarily due to the transfer of the protein, some studies tried to show that Tau is able to be cell-to-cell transferred. *In vitro*, several studies are showing the active transfer of mutated or truncated Tau aggregates from cell-to-cell through the culture medium (Frost *et al*, 2009a; Kfoury *et al*, 2012; Yanamandra *et al*, 2013). *In vivo*, this transfer is shown in one model of lamprey (Kim *et al*, 2010b; Lee *et al*, 2012).

As Tau proteins are transferred from cell-to-cell, it implicates specific cellular mechanisms. Tau protein is a cytosolic protein thus its secretion via the conventional exocytosis implicating the Golgi apparatus is hardly conceivable. Therefore, several studies tried to show different routes of secretion and particularly some particular extracellular

vesicles named exosomes. During endocytosis, invagination of the plasma membrane leads to the formation of the primary endosome. Other invaginations occur in the membrane of this endosome leading to the formation of a multivesicular body. During this step, the intraluminal vesicles trap cytoplasmic material. When the multivesicular body fuses with the plasma membrane, the intraluminal vesicles are released and called exosomes. Exosomes are largely characterized (figure 16, for review: Kowal *et al*, 2014; Rajendran *et al*, 2014) and were shown to carry prion (Fevrier *et al*, 2004), A β peptide (Rajendran *et al*, 2006) and synuclein (Lee *et al*, 2005; Alvarez-Erviti *et al*, 2011). Moreover, it was shown that exosomes convey some lipids which potentiates fibrillogenesis and accelerates the formation of amyloid structures (Yuyama *et al*, 2008). In the case of tauopathies, the implication of exosomes remains controversial. Indeed, certain authors are describing the presence of Tau in exosomes purified from non-neuronal cells overexpressing Tau (Saman *et al*, 2012; Simón *et al*, 2012b), whereas other studies failed to reproduce these results in different models (Fauré *et al*, 2006; Santa-Maria *et al*, 2012; Karch *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015). Several studies are showing that extracellular Tau is mostly found free in the medium, non-associated with vesicles but the secretory pathway was not identified. A recent study shows that in case of overexpression, Tau is relocalized, thanks to the mTor kinase, in autophagic vesicles and in the endoplasmic reticulum, suggesting the existence of an exocytosis mechanism (Tang *et al*, 2015 ; figure 16). Free aggregates present in the culture medium seem to be internalized via macropinocytosis mediated by heparan sulfate proteoglycans (Frost *et al*, 2009a; Holmes *et al*, 2013; Wu *et al*, 2013). It is likely that other receptors more specific are also implicated in these mechanisms. Additionally, the presence of Tau in the extracellular media is stimulated by neuronal activity (Pooler *et al*, 2013a; Yamada *et al*, 2014). Interestingly, Tau proteins seem to be mainly dephosphorylated and truncated in their carboxy-terminal part when secreted (Plouffe *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Mohamed *et al*, 2014). However, truncation of Tau is not retrieved in every model (Chai *et al*, 2012). The mechanisms of secretion described above were mainly identified *in vitro* and it is likely that they represent a physiological secretion rather than pathological processes (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a). Indeed, a secretory pathway may take part in the propagation of Tau pathology, but to date, there is no definitive evidence. Moreover, besides the secretion of free Tau or via exosomes, other routes like nanotubes or other extracellular vesicles cannot be excluded (Gousset *et al*, 2009 ; figure 16).

Whether some species of Tau are more propagative than others remains unknown. Indeed, if extracellular Tau proteins seem to be mainly dephosphorylated and truncated

(Plouffe *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Mohamed *et al*, 2014; Kim *et al*, 2010a), it is not the case for every model (Chai *et al*, 2012; Karch *et al*, 2012; Yamada *et al*, 2011). Also, the research group led by Dr Kaye has investigated oligomeric forms of Tau that seem to propagate more efficiently Tau pathology by seeding (Lasagna-Reeves *et al*, 2012a; 2012b). Moreover, the authors argued that Tau oligomers are early pathological species appearing before hyperphosphorylation confirming recent data from Dr Diamond's group (Holmes *et al*, 2014). Also, these oligomers seem to spread the pathology more efficiently than aggregates (Lasagna-Reeves *et al*, 2012a; Polydoro *et al*, 2014).

In addition, similar to the prion, strains of Tau were described with distinct behaviours. Particularly, mutated Tau proteins seem to bear different fiber morphologies and biochemical characteristics that influence the ability of seeding (Aoyagi *et al*, 2007; Frost *et al*, 2009b; Falcon *et al*, 2015). Fibers with various Tau isoforms have also variable properties (Adams *et al*, 2010; Furukawa *et al*, 2011; Nonaka *et al*, 2010; Levarska *et al*, 2013). These strains could explain the different morphologies of lesions observed in human pathologies and transmissible to animal or cell models (Clavaguera *et al*, 2013a; Sanders *et al*, 2014). These strains could also explain the different spatiotemporal evolution of Tau pathology.

In conclusion, Tau protein shares some common features with prions. Indeed, Tau proteins aggregate in amyloid structures that are able to transmit the pathology by recruiting endogenous proteins via a seeding mechanism. Different strains of Tau fibrils exist with variable morphological and physicochemical properties. Finally, Tau protein is able to transfer from cell-to-cell and this mechanism may explain Tau pathology propagation. However, we should separate the physiological propagation of Tau that seems to exist and the pathological mechanisms as, to date, nobody has shown pathological secretion/internalization mechanisms. It is also important to highlight that currently, the studies investigating Tau propagation and prion-like properties face the relevance of study models. Indeed, in most of the models, pro-aggregating Tau species like truncated and/or mutated Tau are used. Although these species are of major interest particularly for the study of Tau aggregation, profound differences in physicochemical properties have been shown between these species and wild-type Tau. Moreover, the tauopathies with spatiotemporal evolution of Tau pathology are sporadic. In order to validate all the data about Tau propagation, we should verify them using sporadic tauopathies models.

OBJECTIFS

Les Tauopathies et notamment la maladie d'Alzheimer sont des pathologies neurodégénératives hétérogènes et complexes caractérisées par l'agrégation de la protéine Tau. En effet, cette protéine physiologiquement multifonctionnelle est anormalement modifiée, change de structuration et s'agrège à l'intérieur de la cellule durant les tauopathies. L'étude de l'agrégation de cette protéine ainsi que des mécanismes physiopathologiques qui en découlent est l'objectif principal du laboratoire. Mais ce projet de thèse s'inscrit plus particulièrement au sein d'un groupe de recherche qui s'est constitué autour de la thématique de la propagation de Tau.

Dans certaines tauopathies, en effet, des études neuropathologiques ont montré que les lésions qui résultent de l'agrégation de la protéine Tau suivent des chemins neuroanatomiques bien définis depuis un site d'initiation jusqu'à envahir des zones cérébrales éloignées. Une hypothèse récente propose que des protéines Tau dans une conformation pathologique seraient capables de se propager de cellule en cellule et de recruter des protéines endogènes du neurone secondaire. Cette hypothèse a émergé à la suite d'une étude publiée en 2009 montrant la transmissibilité de la pathologie Tau d'une souris à une autre (Clavaguera *et al*, 2009). La compréhension de ces mécanismes est d'une importance majeure pour comprendre la physiopathologie des tauopathies mais revêt également de grands espoirs quant au développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. C'est dans ce contexte que dès 2009, nous avons tenté, en parallèle des différentes études présentées ci-dessus, de disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires de propagation de la protéine Tau dans des modèles originaux de tauopathies. L'objectif général de ce travail de thèse peut être divisé en plusieurs sous-objectifs.

L'évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau n'étant décrite que dans trois tauopathies sporadiques, nous nous sommes fixés comme premier pré-requis de développer des modèles d'études de tauopathies sporadiques afin d'étudier la propagation de la protéine Tau sauvage. A travers ces modèles, nous avons ensuite étudié la propagation de la protéine Tau ainsi que la progression spatio-temporelle de la DNF. Nous avons ensuite mis en place deux projets visant à comprendre les mécanismes de cette propagation 1) au niveau moléculaire en comparant les isoformes de Tau ainsi que les protéines Tau mutées ou sauvages quant à leur propension à propager la pathologie, 2) au niveau cellulaire où nous avons cherché à comprendre comment, dans nos modèles, la protéine Tau est transférée de cellule en cellule.

OBJECTIVES

Tauopathies and particularly AD are heterogenous neurodegenerative pathologies characterized by the aggregation of Tau proteins. This protein physiologically multifunctional encounters abnormal modifications, structuration changes and aggregates into cells during tauopathies. The study of Tau aggregation and pathophysiological mechanisms of tauopathies is the main purpose of our laboratory. However this PhD project takes place in a research group about Tau propagation. In some tauopathies, Tau lesions were shown to follow well-defined neuroanatomical pathways from the pathology initiation site and invading distant cerebral areas. A recent hypothesis following a study showing that Tau pathology is transmissible from mice-to-mice, has proposed that Tau proteins in a pathological conformation are able to propagate from cell-to-cell and to recruit endogenous proteins of the secondary neuron (Clavaguera *et al*, 2009). Deciphering these mechanisms is of major importance in order to understand the pathophysiology of tauopathies but also to develop new diagnosis and therapeutic tools. In this context, from 2009, we have tried, in parallel with the other studies presented above, to investigate the cellular and molecular mechanisms of Tau protein propagation using original models of tauopathies. This general objective can be divided in several sub-objectives.

The spatiotemporal evolution of Tau pathology is described only in three sporadic tauopathies. Therefore we aimed to develop models in order to study sporadic tauopathies and to decipher the mechanisms of wild-type Tau propagation as well as the NFD spatiotemporal evolution. We then carried out two projects designed to understand the mechanism of Tau propagation: 1) at the molecular level comparing the ability to propagate of the different Tau isoforms but also of mutated and wild-type Tau and 2) at the cellular level, we aimed to understand how, in our models, Tau proteins are transferred from cell-to-cell.

RESULTATS / RESULTS

Chapitre 0 : Modélisation de plusieurs tauopathies.

I- Introduction

La modélisation de la pathologie Tau est un enjeu majeur pour la recherche sur les tauopathies. En effet, il existe une multitude de modèles allant de simples cellules exprimant la protéine Tau jusqu'à des modèles de mammifères plus complets. Dès 1998, la découverte des premières mutations du gène MAPT (Poorkaj *et al*, 1998; Hutton *et al*, 1998; Spillantini *et al*, 1998; Dumanchin *et al*, 1998; Clark *et al*, 1998) a mené les chercheurs à les utiliser pour modéliser les tauopathies. En effet, ces mutations sont pro-agrégatives, accélérant les processus pathologiques chez les patients atteints de FTDP-17 mais également dans les modèles animaux. Les protéines Tau sauvages sont au contraire à l'origine d'un processus de dégénérescence neurofibrillaire très lent. De plus, très rares sont les modèles exprimant une protéine Tau sauvage et résumant les principales caractéristiques de la pathologie Tau (hyperphosphorylation / agrégation / développement progressif). Dans l'annexe 2, nous résumons les différents modèles animaux de tauopathies en ajoutant notamment les modèles récents permettant l'étude de la propagation de la protéine Tau (Dujardin *et al*, 2015, annexe 2). Ainsi, connaissant les différences fondamentales en terme de comportement *in vivo* mais également de propriétés biochimiques des protéines Tau mutées et sauvages, notre premier objectif était de développer des modèles de tauopathies sporadiques primaires nous permettant de résumer la DNF ainsi que le développement progressif de la pathologie Tau dans le système cérébral d'un mammifère. Pour ce faire, nous avons d'abord développé de nouveaux vecteurs lentiviraux (LVs) permettant la surexpression de la protéine Tau sauvage dans les neurones pyramidaux de la couche CA1 dans l'hippocampe des rats, une zone affectée de manière précoce dans la MA (Braak & Braak, 1991). La technologie lentivirale nous a permis de pouvoir tester plusieurs transgènes et de comparer notamment les protéines Tau mutées et sauvages entre elles. Dans la première étude, nous avons sélectionné l'isoforme 1N4R de la protéine Tau car elle est l'isoforme de la protéine Tau la plus fréquente dans le cerveau humain adulte (Andreadis, 2005). Nous avons été ainsi capables de montrer que la surexpression de la protéine Tau humaine sauvage permet le développement lent en progressif

Résultats – Chapitre 0

de la dégénérescence neurofibrillaire rappelant les caractéristiques des tauopathies sporadiques comme la MA, l'AGD ainsi que la PSP. Au contraire quand une protéine Tau mutée est surexprimée, les processus neurodégénératifs sont rapides entraînant la mort précoce des cellules de manière cohérente avec ce qui est observé dans les FTDP-17. En collaboration avec l'équipe du Dr Philippe Hantraye (MIRCen, UMR 9199, Fontenay-aux-Roses), nous avons également participé au développement et à la caractérisation d'un modèle de Primate Non Humain (PNH) basé sur une technologie d'injection, dans l'hippocampe, de vecteurs viraux issus des « adenovirus associated-virus » (AAV) codant pour la protéine Tau humaine sauvage ou mutée.

II- Article 1 : Lentiviral Delivery of the Human Wild-type Tau Protein Mediates a Slow and Progressive Neurodegenerative Tau Pathology in the Rat Brain

REFERENCE: Caillierez R, Bégard S, Lécolle K, Deramecourt V, Zommer N, Dujardin S, Loyens A, Dufour N, Aurégan G, Winderickx J, Hantraye P, Déglon N, Buée L & Colin M (2013) Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Mol. Ther.* **21**: 1358–1368

AUTHORS: Raphaëlle Caillierez^{1,2}, Séverine Bégard^{1,2}, Katia Lécolle^{1,2}, Vincent Deramecourt^{1–3}, Nadège Zommer^{1–3}, Simon Dujardin^{1,2}, Anne Loyens^{1,2}, Noëlle Dufour^{4,5}, Gwennaëlle Aurégan^{4,5}, Joris Winderickx⁶, Philippe Hantraye^{4,5}, Nicole Déglon^{4,5,7}, Luc Buée^{1–3} and Morvane Colin^{1–3}

¹Inserm, UMR837, Lille, France; ²Université Lille 2, Faculté de Médecine, IMPRT, JPARC, Lille, France; ³CMRR, CHR, Lille, France; ⁴Atomic Energy Commission (CEA), Institute of Biomedical Imaging (I2BM), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France; ⁵CNRS, URA2210, Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France; ⁶Functional Biology, KU Leuven, Heverlee, Belgium; ⁷Present address: Department of Clinical Neurosciences (DNC), Lausanne University Hospital (CHUV), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LMCN), Lausanne, Switzerland

ABSTRACT:

Most models for tauopathy use a mutated form of the Tau gene, *MAPT*, that is found in frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) and that leads to rapid neurofibrillary degeneration (NFD). Use of a wild-type (WT) form of human Tau protein to model the aggregation and associated neurodegenerative processes of Tau in the mouse brain has thus far been unsuccessful. In the present study, we generated an original “sporadic tauopathy-like” model in the rat hippocampus, encoding six Tau isoforms as found in humans, using lentiviral vectors (LVs) for the delivery of a human WT Tau. The overexpression of human WT Tau in pyramidal neurons resulted in NFD, the morphological characteristics and kinetics of which reflected the slow and sporadic neurodegenerative processes observed in sporadic tauopathies, unlike the rapid neurodegenerative processes leading to cell death and ghost tangles triggered by the FTDP-17 mutant Tau P301L. This new model highlights differences in the molecular and cellular mechanisms underlying the

III- Résultats complémentaires

L'article ci-dessus présente un modèle original de tauopathie primaire se développant progressivement suite à la surexpression, médiée par des vecteurs lentiviraux, de la protéine Tau soit sauvage soit mutée. Un des avantages de l'utilisation des vecteurs viraux est de nous permettre de pouvoir tester des constructions variées. Nous avons donc utilisé notre modèle pour modéliser des tauopathies 3R et étudier leurs différences avec les tauopathies 4R. En complément de ces résultats, un modèle similaire a été développé chez le PNH afin de tester, notamment, des techniques d'imagerie ainsi que de nouveaux biomarqueurs dans un modèle plus proche de l'Homme et plus pertinent.

III.1. Développement et caractérisation d'un modèle de PNH de tauopathies permettant de valider de nouveaux biomarqueurs biochimiques et d'imagerie.

Suite aux résultats présentés dans l'article précédent, nous avons été contacté par l'équipe du Dr Hantraye (MIRCent, UMR 9199, Fontenay-aux-Roses), pour développer, en collaboration avec eux, un modèle qui serait le pendant primate de notre modèle murin. En associant les expertises des deux équipes, nous avons ainsi voulu lancer une étude avec deux objectifs principaux :

- 1) Créer une pathologie similaire à celle observée dans les tauopathies humaines, chez le PNH avec une cascade d'évènements délétères au niveau cellulaire et moléculaire menant aux déficits cognitifs.
- 2) Créer un modèle suffisamment pertinent et prédictif pour valider de nouveaux biomarqueurs des tauopathies ainsi que des marqueurs pour imagerie à résonance magnétique (IRM) ou tomographie à émission de positon (PET).

Trois animaux pilotes nous ont permis de déterminer les conditions optimales d'injection. Sur ces animaux, nous avons comparé l'expression de vecteurs lentiviraux et de vecteurs scAAVs (pour self complementary Adeno-Associated Virus). Ces vecteurs viraux à ADN simple brin sont conçus pour s'hybrider en intramoléculaire formant un ADN double brin. Celui-ci peut alors s'exprimer directement évitant l'étape limitante de la synthèse du deuxième brin d'ADN augmentant ainsi la quantité d'expression du transgène dans les cellules cibles (McCarty, 2008). Suite à cette expérience pilote et afin de favoriser

l'apparition de signal en imagerie cérébrale, nous avons privilégié l'utilisation de vecteurs de type AAVs, leurs expressions se révélant plus forte qu'avec les vecteurs lentiviraux.

Des tests cognitifs pré-infection (baseline) et une IRM préopératoire ont alors été réalisés sur 11 PNH. Ceux-ci ont ensuite été injectés avec des AAVs de sérotype 2/9, promoteur CBA (Chicken β -actin) selon trois groupes : 4 PNH avec la construction Tau sauvage : scAAV2/9-CBA-hTau1N4R-WPRE, 4 PNH avec la construction Tau mutée : scAAV2/9-CBA-hTau1N4RP301L-WPRE, et 3 PNH avec une construction contrôle exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) mais avec un codon stop inséré empêchant la traduction protéique : scAAV2/9-CBA-Stop-GFP-WPRE (GFPnt). Trois injections bilatérales (10 μ L par injection – concentration virale : 4.10¹³ vg/ml (viral genome containing particles/ml)) ont été réalisées à différentes coordonnées de la couche CA1 de l'hippocampe (figure 17, procédure de production virale : voir (Berger *et al*, 2015) ; Procédures d'injection chez le primate : voir (Ben Haim *et al*, 2015)).

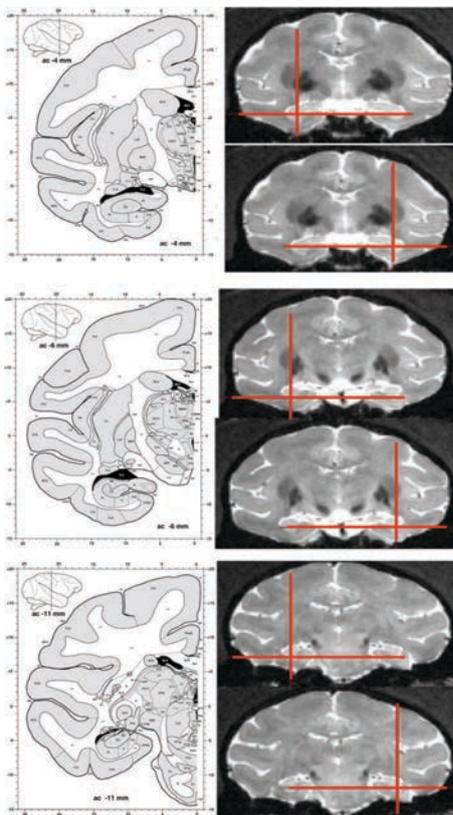


Figure 17- Les six sites d'injection dans le cerveau du macaque sont représentés par les intersections entre les droites rouges sur ces images d'IRM préopératoires en coupe coronale.

Figure 17- The six injection sites into the non-human primate (NHP) brain are represented by the junctions of the red lines on these coronal preoperative MRI (magnetic resonance imaging) images.

Après injection, une étude cinétique a été réalisée pour suivre la cognition des PNH (4, 8 et 12 mois post-injection), l'apparition de biomarqueurs sanguins et LCR (Prélèvements à 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 et 12 mois post-injection) ainsi que l'apparition de lésions visibles en imagerie (IRM à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 mois post-injection).

III.1.1. Tests cognitifs

Pour tester la cognition des macaques, trois tests ont été réalisés : deux tests spécifiques de l’hippocampe (Memory 30 et DNMS) ainsi qu’un test permettant de juger des capacités opérationnelle des singes (VDT). Le principe détaillé de ces différents tests est expliqué en annexe (annexe 4).

Le test VDT nous montre que les performances des trois groupes d’animaux sont similaires au stade pré-infection démontrant que le degré d’attention et de motivation des animaux ainsi que leur capacité à réaliser un test sur écran tactile reste intact le long de l’étude (figure 18A).

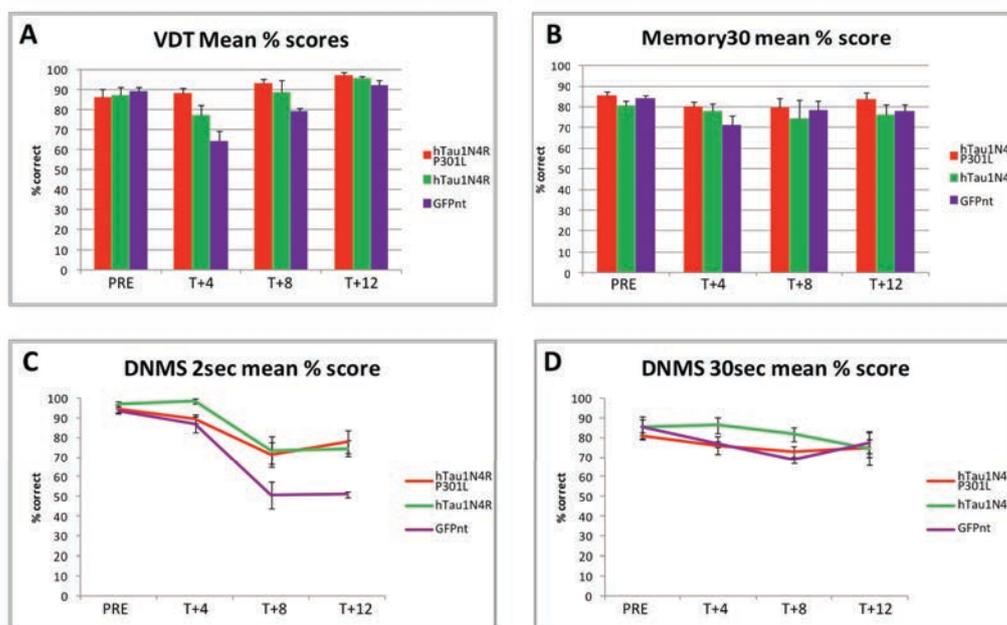


Figure 18- Résultats des tests cognitifs chez les PNH. **A-** Performances (exprimées en % de réponses correctes au cours de 4 sessions consécutives) des animaux dans la tâche VDT (‘Visual Discrimination Task’). **B-** Performances (exprimées en % de réponses correctes au cours de 4 sessions consécutives) des animaux dans la tâche Memory 30. **C/D-** Performances au DNMS avec des délais de 2 et 30 secondes. Les résultats sont présentés au stade pré-injection (PRE), et à 4 (T+4), 8 (T+8) et 12 (T+12) mois post-injection chez les PNH appartenant aux groupes hTau1N4RP301L (n=4, rouge), hTau1N4R (n=4, vert), et GFPnt (n=3, violet).

Figure 18- Cognitive tests on NHP. **A-** Performances (expressed as a % of correct answer during 4 successive sessions) to the VDT (‘Visual Discrimination Task’). **B-** Performances (expressed as a % of correct answer during 4 successive sessions) to the Memory 30 test. **C/D-** Performances to the DNMS (‘Delayed nonmatching to sample’) with a delay of 2 and 30 seconds. Results are shown at the pre-injection stage (PRE), and at 4 (T+4), 8 (T+8) and 12 (T+12) months post-injection in the NHP overexpressing hTau1N4RP301L (n=4, red), hTau1N4R (n=4, green), and GFPnt (n=3, violet).

Pour le test memory 30, même si une faible baisse des performances est observée dans le groupe contrôle GFPnt ainsi que pour le groupe hTau1N4R, 4 mois post-injection, aucune différence statistique n'est notée entre les groupes. Ces résultats indiquent une préservation des capacités de rétention mnésique des singes et souligne que des performances mnésiques consolidées avant le déclenchement d'un processus pathologique comme celui induit par la surexpression locale de la protéine tau sauvage ou mutée P301L ne sont pas affectées significativement (figure 18B). Le test DNMS, quant à lui, nous montre, avec le délai court de deux secondes, des performances altérées chez tous les animaux au cours du temps post-injection. De manière surprenante, la baisse de performance la plus élevée, et statistiquement significative, a été observée dans le groupe GFPnt, suggérant une lésion hippocampique chez les animaux de ce groupe (Voir résultats IRM plus bas ; figure 18C). Avec un long délai de 30 secondes, aucun effet groupe n'est mis en évidence même si une baisse significative des performances est observée chez tous les PNH (figure 18D). Ces résultats mettent en évidence des atteintes cognitives chez les animaux mais l'analyse est entravée par les données observées chez le groupe témoin, résultant de lésions hippocampiques importantes (voir les résultats d'imagerie ci-après).

III.1.2. Imagerie

Une imagerie IRM (Pondération T2) a été réalisée sur chaque animal aux différents temps de cinétique. Celle-ci a permis de montrer qu'aucun des macaques injectés avec les constructions hTau1N4R et hTau1N4RP301L ne présentent d'anomalies morphologiques détectables à l'IRM (figure 19A). Par contre, de manière surprenante, les animaux injectés avec le vecteur GFPnt montre une atrophie hippocampale marquée à 8 mois post-injection (figure 19B ; pour les procédures d'IRM, voir Lavis *et al*, 2015).

Une imagerie PET a également été réalisée avec différents radiotraceurs dont le ^{18}F -Fluorodéoxyglucose qui est très utilisé pour suivre le degré d'atteinte du métabolisme énergétique reflétant notamment l'efficacité synaptique. Nous avons également utilisé le ^{18}F -DPA714, un ligand de la TSPO (pour translocator protein 18 kDa) et qui est un indicateur fiable de la réponse neuroinflammatoire (Boutin *et al*, 2013). Enfin, un des objectifs de la création de ce modèle était de tester de nouveaux radiotraceurs de protéines Tau agrégées. Nous avons décidé de tester le traceur ^{18}F -T808 développé récemment et qui a donné plusieurs résultats encourageants même si des résultats récents montrant une fixation non spécifique chez certains patients ont freiné son développement clinique (Zhang *et al*, 2012;

Ariza *et al*, 2015). Pour les analyses en imagerie PET, le groupe contrôle est constitué de PNH non injectés. L'analyse des données a permis de détecter une tendance à la baisse du métabolisme énergétique chez les animaux injectés avec les constructions hTau1N4R et hTau1N4RP301L par rapport à des animaux non-injectés (figure 20A). Aussi, une augmentation significative de la neuroinflammation peut être détectée 12 mois post-injection avec une réponse plus importante chez les animaux surexprimant la protéine Tau mutée (figure 20B ; pour les procédures de PET-Scan, voir Lavisse *et al*, 2015). Par contre, les résultats obtenus avec le ligand de Tau se sont avérés décevants, suggérant une fixation non-spécifique du ligand et ne sont donc pas analysables.

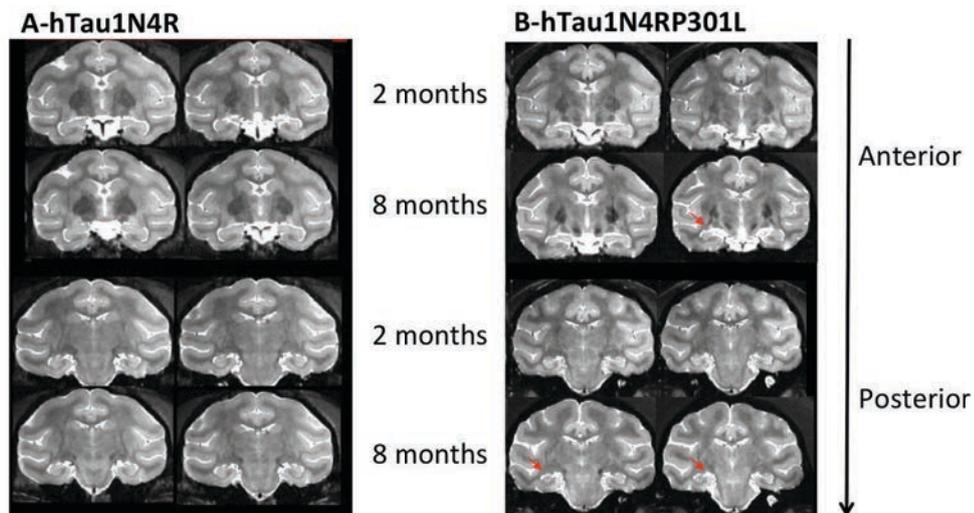


Figure 19- Imagerie IRM réalisée chez les PNH. **A-** Images IRM coronales pondérées en T2 du cerveau d'un singe représentatif injecté avec la construction hTau1N4R. Aucune modification morphologique détectable ne peut être mise en évidence. **B-** Images IRM coronales pondérées en T2 du cerveau d'un singe représentatif injecté avec la construction GFPnt. Des anomalies morphologiques importantes (atrophie hippocampale, hypersignal correspondant à une prise de contraste LCR liée à l'augmentation de l'espace ventriculaire) sont détectables entre 2 et 8 mois après injection des vecteurs viraux et sont indiqués par des flèches rouges sur les images.

Figure 19- MRI imaging realized on the NHP. **A-** coronal MRI images with a T2 ponderation of the brain of a representative NHP injected with the construct hTau1N4R. No morphologic modifications are detected. **B-** coronal MRI images with a T2 ponderation of the brain of a representative NHP injected with the construct GFPnt. Significant morphologic abnormalities (hippocampal atrophy, CSF detection by contrast enhancement consecutively to the increase of the ventricular volume, indicated with red arrows) are detected between 2 and 8 months post Adeno-Associated Viral vectors (AAVs) delivery.

III.1.3. Biomarqueurs

Une analyse cinétique a été réalisée, chez ces primates, pour tester l'apparition de biomarqueurs dans le LCR et le plasma. Nous avons donc d'abord procédé à des dosages ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour détecter la protéine Tau (Pour les

Résultats – Chapitre 0
procédures d'ELISA, voir Dujardin *et al*, 2014a page 194). Aucune différence significative dans la quantité de Tau dans le plasma et dans le LCR n'a été découverte avec le temps et entre les groupes. Nous avons donc testé, avec une technique d'ELISA multiplex (V-PLEX NHP Cytokine 24-Plex Kit, Meso Scale Discovery, suivant les procédures indiquées par le fabricant), l'apparition potentielle de plusieurs marqueurs inflammatoires du PNH dans les fluides biologiques. De manière intéressante, parmi les marqueurs testés, plusieurs ressortent positifs notamment dans le plasma (Table 2). Le seul marqueur sortant positif dans le LCR est MCP-1/CCL-2. Même si les résultats ne sont pas significatifs, chez les primates surexprimant une forme mutée, les concentrations de ces cytokines semblent être plus importantes. Ces résultats suggèrent donc qu'une réaction inflammatoire a probablement lieu chez ces PNH et confirment les données obtenues en PET-Scan.

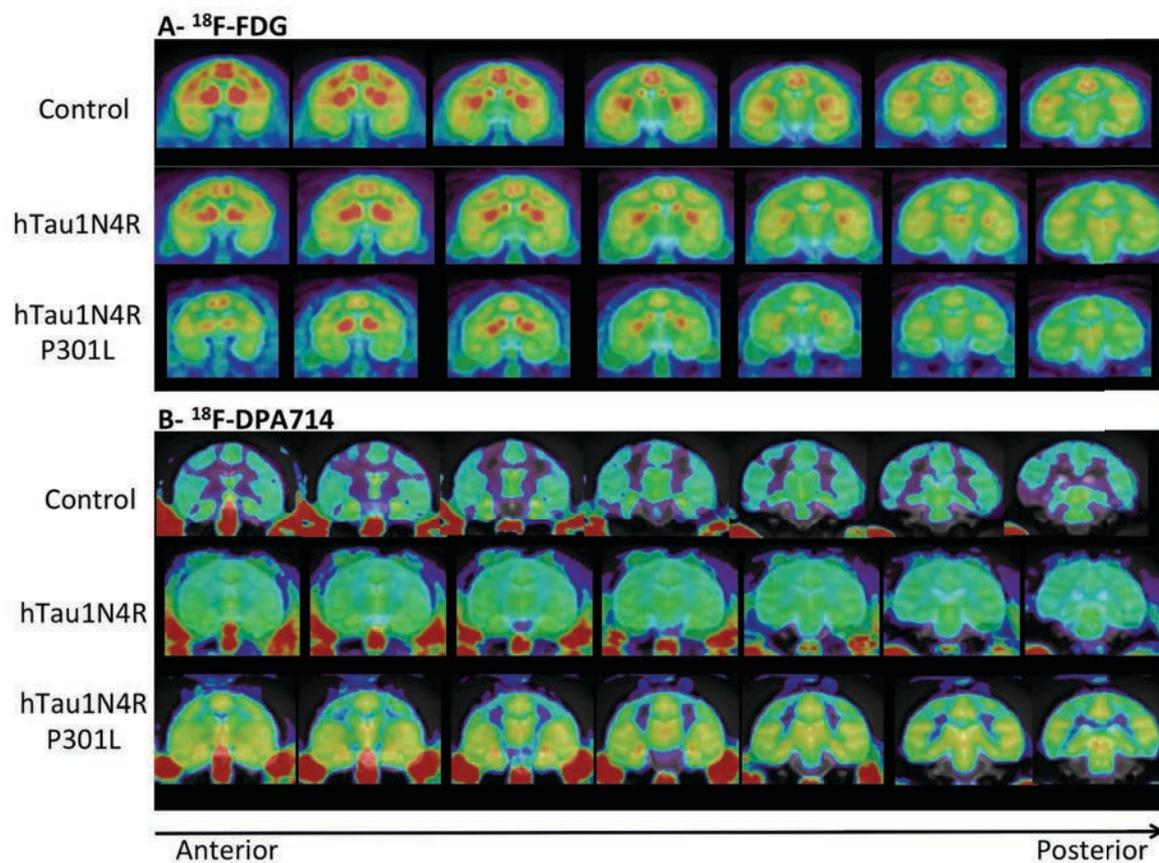


Figure 20- Quantification et distribution du métabolisme du glucose (A) et de l'expression de la TSPO (B) sur des images paramétriques acquises avec respectivement du ¹⁸F-FDG et du ¹⁸F-DPA-714. Images coronales représentatives obtenues chez des animaux témoins et des animaux injectés avec des vecteurs codant la protéine hTau1N4R ou hTau1N4RP301L.

Figure 20- Quantification and distribution of the glucose metabolism (A) and the expression of TSPO (B) on parametric images acquired respectively with ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-DPA-714. Coronal representative images obtained on control animals and injected animals with viral vectors encoding hTau1N4R or hTau1N4RP301L.

Table 2 : positive inflammatory factors in plasma and CSF of NHP

Positive (Value > LLOQ)	Negative (Value < LLOQ)
IL-16	Eotaxin-3
IP-10	IL-8
MCP-1 / CCL-2	MIP-1 α
MCP-4	TARC (=CCL-17)
MDC (CCL-22)	GM-CSF
MIP-1β	IL-15
IL-12	IL-17 α
IL-7	IL-5
VEGF	TNF β
	IFN γ
	IL-1 β
	IL-10
	IL-2
	IL-6

LLOQ= Lower Limit Of Quantification

III.1.4. Analyse en immunohistochimie post-mortem

Après avoir sacrifié les animaux, les cerveaux ont été récupérés pour analyse en immunohistochimie (conditions d'immunohistochimie, voir Dujardin *et al*, 2014b, page 141). A l'instar de ce que nous avons réalisé chez le rat, des marquages avec les anticorps AT8 (hyperphosphorylation), MC1 (changement conformationnel pathologique) et AT100 (hyperphosphorylation spécifique de protéines Tau insolubles) ont été réalisés sur les coupes coronales des cerveaux des 8 PNH injectés avec les constructions hTau1N4R ou hTau1N4RP301L. Douze mois post-injection, l'immunomarquage AT8 et MC1 envahit l'entièreté de l'hippocampe chez les animaux injectés avec les deux constructions (figure 21). Nous pouvons également retrouver du marquage AT100 dans les deux groupes. Il est à noter que ce marquage est principalement présent chez les animaux surexprimant la construction hTau1N4RP301L avec 3 animaux sur 4 présentant des NFT ainsi que des fibres autour du site d'injection (figure 22). Pour la construction hTau1N4R, des NFTs marqués AT100 sont retrouvés chez un seul animal. Cependant, un autre animal présente du marquage AT100 fibrillaire (figure 22).

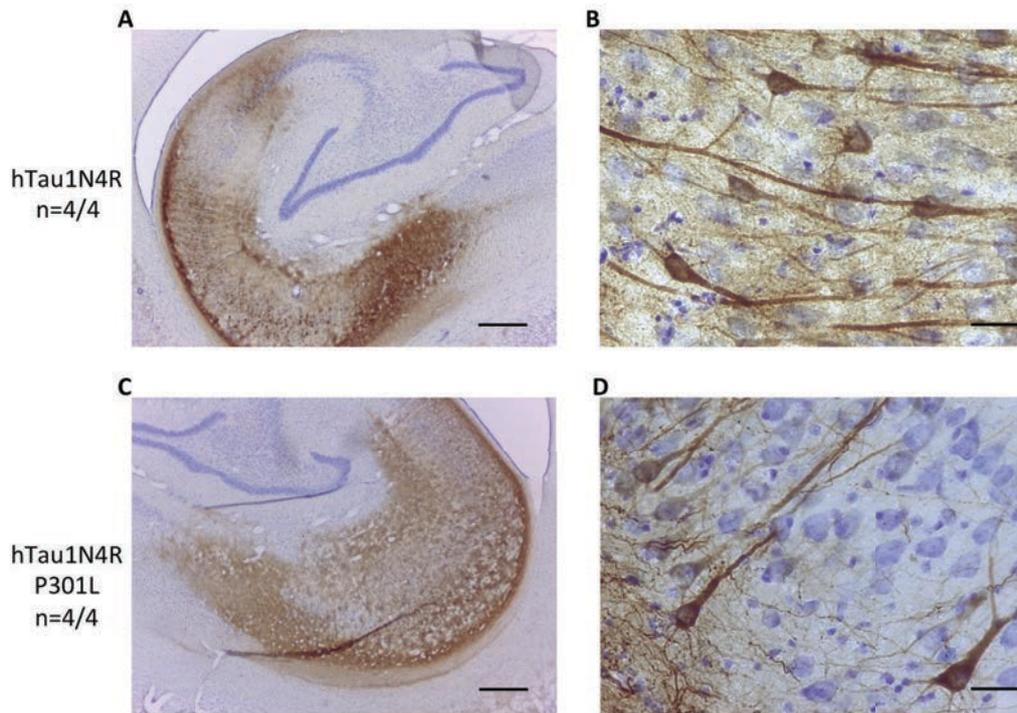
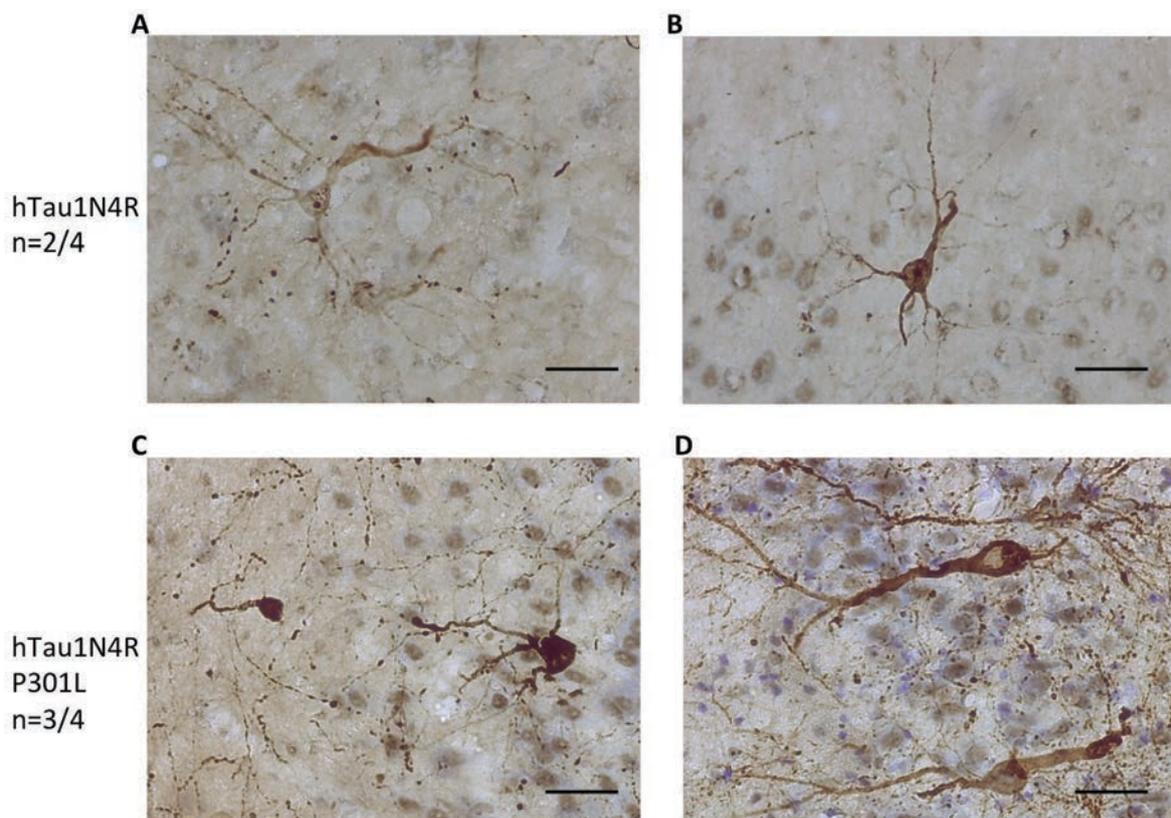


Figure 21- Images représentatives de l'hippocampe des PNH surexprimant la construction sauvage (A-B) ou mutée (C-D) après immunomarquage MC1 observés à grossissement faible (X2,5 ; A-B) ou fort (X20 ; C-D). Barres d'échelle : A/C = 0,5 mm, B/D = 50 μm

Figure 21- Representative images of the NHP hippocampus overexpressing the wild-type (WT) (A-B) or mutated (C-D) constructs after an immunolabelling MC1 and observed at weak (X2,5 ; A-B) or strong (X20 ; C-D) magnification. Scale bar: A/C = 0,5 mm, B/D = 50 μm



← **Figure 22-** NFT immunopositifs pour l'anticorps AT100 observés en microscopie photonique dans l'hippocampe des PNH injectés avec des AAV codant pour la protéine Tau humaine sauvage 1N4R (**A-B**) ou la protéine Tau humaine mutée en P301L (**C-D**). Il est à noter que seul deux primates injectés avec la construction sauvage présente du marquage AT100 et des structures de type NFT ne sont retrouvées que chez l'un des deux. Par contre, 3 primates sur 4 injectés surexprimant la construction mutée présentent des NFT. Grossissement X20, barres d'échelle = 50 μ m

Figure 22- AT100 Immunopositive NFT observed with photonic microscopy in the hippocampus of NHP injected with AAV encoding human WT 1N4R-Tau (**A-B**) or human 1N4R-Tau mutated in P301L (**C-D**). It should be noted that only two NHP injected with the WT construct are showing AT100 immunolabelling and NFT-like structures are seen only in one. Contrariwise, 3 NHP on 4 overexpressing the mutated construct are showing NFT. Magnification X20, scale bars = 50 μ m

De manière cohérente avec les résultats observés en PET et en ELISA, l'existence d'un immunomarquage HLA-DR a permis de mettre en évidence une réaction inflammatoire (figure 23). Aucune perte neuronale n'est par contre détectable avec un marquage NeuN chez les animaux surexprimant la protéine Tau sauvage ou mutée au contraire des animaux exprimant la protéine GFPnt. Ces résultats confirment l'effet délétère du vecteur viral GFPnt et nous indiquent clairement que ce groupe contrôle est un échec. De nouveaux PNH ont donc été injectés avec du PBS pour palier à ce problème et sont toujours en cours d'analyse.

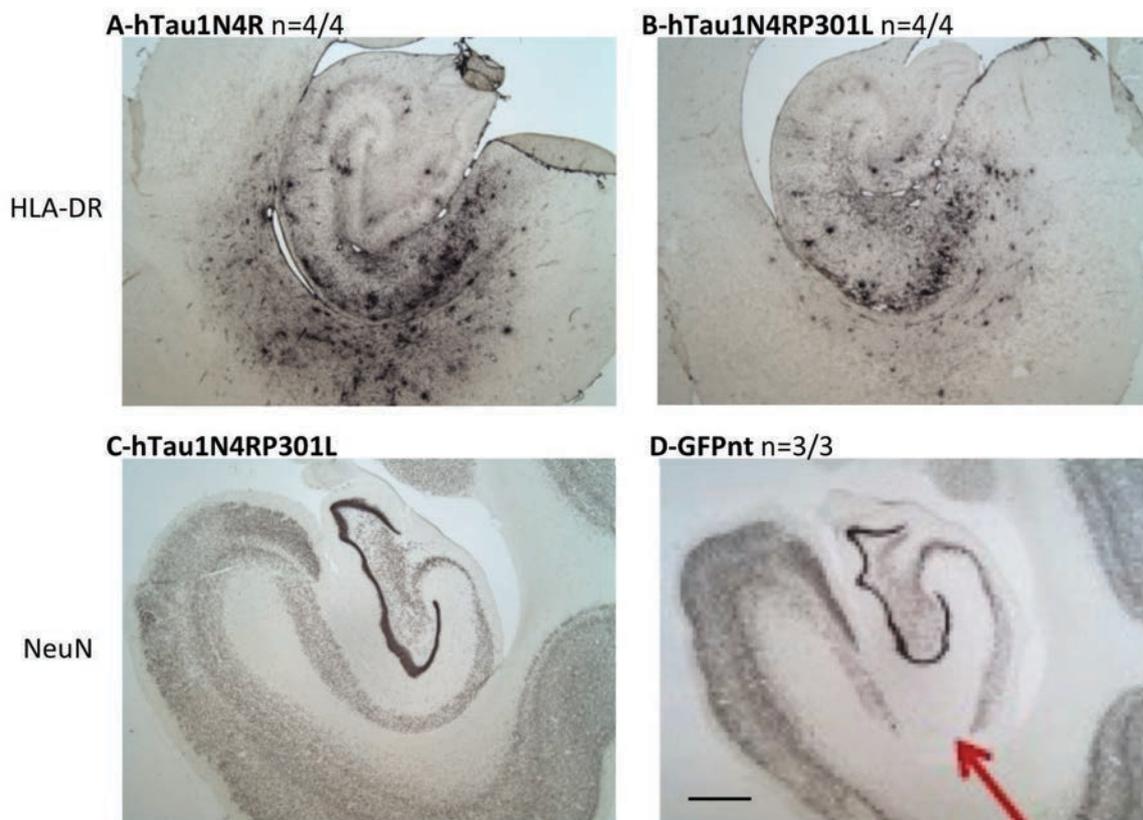


Figure 23- Images représentatives de l'hippocampe des PNH surexprimant la protéine Tau sauvage (**A**), mutée (**B/C**) ou la protéine GFPnt (**D**) après immunomarquage HLA-DR (**A-B**) ou NeuN (**C-D**). Il est intéressant de noter une réaction gliale importante avec l'anticorps HLA-DR (**A-B**) ainsi qu'une perte neuronale massive observée chez les primates surexprimant la construction GFPnt (**D**) au contraire des primates surexprimant la protéine Tau humaine (**C**). Barre d'échelle = 1,5 mm

← **Figure 23-** Representative images of the hippocampus of NHP overexpressing human WT Tau (A), mutated Tau (B/C) or GFPnt (D) after immunolabelling with HLA-DR (A-B) or NeuN (C-D). Interestingly, a substantial glial reaction can be noticed with the HLA-DR antibody (A-B) and a massive neuronal death is observed on primates overexpressing the GFPnt construct (D) contrarily to NHP overexpressing human Tau (C). Scale bar = 1,5 mm

III.2. Modélisation d'autres tauopathies.

Selon les tauopathies, des différences importantes existent notamment en terme de morphologie des lésions. Ainsi, on peut opposer l'apparition de NFT ou de pathologie gliale dans les tauopathies « 4R » comme la PSP et la présence de corps de Pick dans les pathologies « 3R » comme la maladie de Pick (figure 11). Par ailleurs, comme décrit précédemment, les différentes mutations du gène MAPT peuvent également causer des différences morphologiques. Par exemple, les patients atteints de mutations P301L présentent majoritairement des NFTs alors que comme décrit précédemment, les patients atteints de la mutation P332S découverte à Lille, présentent des lésions de type corps de Pick phosphorylées sur la sérine 422 à l'inverse de ce qui est retrouvé lors de la maladie de Pick (Deramecourt *et al*, 2012, figures 10-11, annexe 3).

Un avantage non-négligeable de notre modèle de rat est notre capacité à tester de multiples constructions pour étudier leur effet au niveau du développement de la pathologie Tau. Nous nous sommes donc demandés si la surexpression de certaines espèces de Tau pouvait nous permettre de reproduire, dans notre modèle, les différences de morphologies lésionnelles retrouvées dans les tauopathies humaines. Ainsi, sommes-nous capables de reproduire des morphologies de type corps de Pick par exemple en surexprimant des formes 3R ou mutées en P332S ? Nous avons ainsi mis au point des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine Tau humaine 1N3R sauvage (hTau1N3R) ou la protéine Tau humaine mutée en P332S (hTau1N4RP332S). Nous avons ensuite lancé une série d'injections de ces vecteurs lentiviraux dans l'hippocampe de rats.

Comme indiqué dans l'article précédent, chez les rats surexprimant une protéine Tau 1N4R sauvage ou mutée en P301L, des lésions de type NFT peuvent être observées au niveau du site d'injection des vecteurs viraux. De manière particulièrement intéressante, que ce soit dans les cerveaux de rats surexprimant une protéine Tau 1N3R sauvage ou encore une protéine Tau 1N4R mutée en P332S, des inclusions denses et proches du noyau, de type corps de Pick, peuvent être observées (figure 24). Ces inclusions peuvent être retrouvées dans plusieurs populations cellulaires dont les neurones pyramidaux de la couche CA1 et les

neurones granulaires du gyrus denté comme ce qui peut être observé dans la pathologie humaine (Deramecourt *et al*, 2012). Par contre, il est intéressant de constater que quand une forme 3R de Tau est surexprimée dans l'hippocampe, une augmentation importante des épitopes d'hyperphosphorylation et de pathologie Tau dans le gyrus denté est observée en comparaison avec une forme 4R sauvage de manière cohérente avec ce qui est observé dans la maladie de Pick (Probst *et al*, 1996). Cependant, cette observation requiert des études et analyses plus poussées car elle est, à ce jour, uniquement observationnelle et non quantifiée. Il serait intéressant de tester différents sites d'injection que la CA1 pour comprendre s'il existe des spécificités de populations cellulaires en terme d'agrégation, de morphologie des lésions et d'évolution de la pathologie.

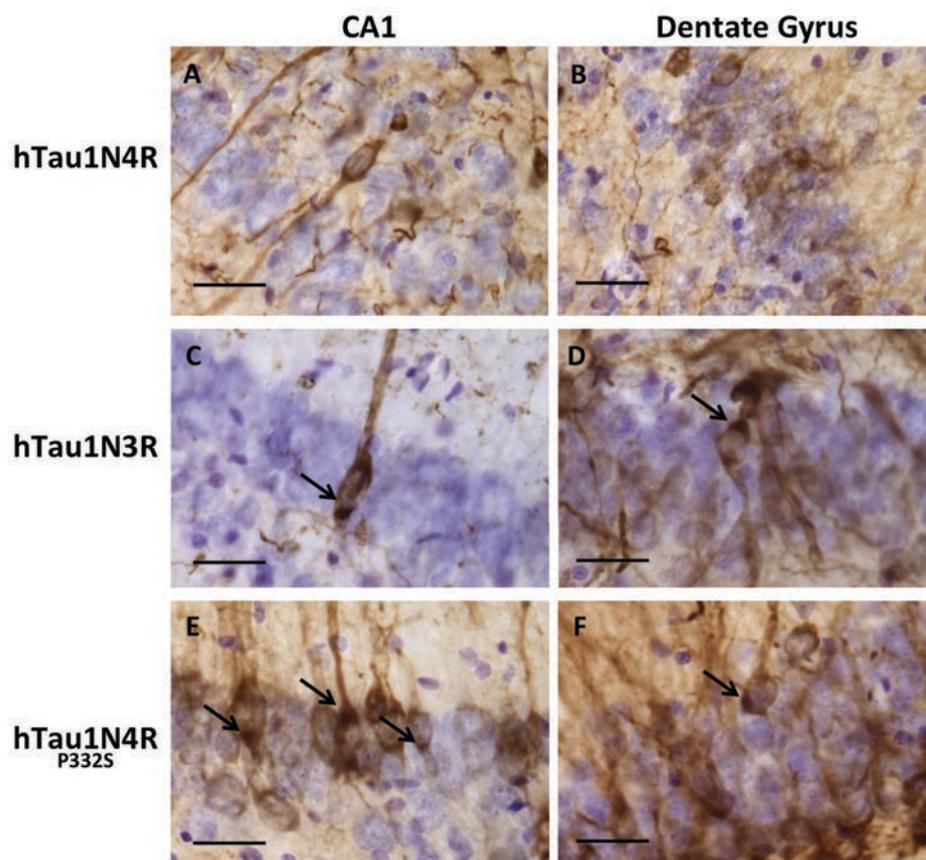


Figure 24- Morphologies des lésions Tau observées avec différentes espèces de Tau. Images représentatives d'Immunohistochimie AT8 dans la couche CA1 de l'hippocampe (A/C/E) et dans le gyrus denté (B/D/F) chez des animaux injectés respectivement avec des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine Tau 1N4R sauvage (A/B), la protéine Tau 1N3R sauvage (C/D) et la protéine Tau 1N4R mutée en P332S (E/F). Nous pouvons noter une morphologie des lésions de type NFT pour la protéine Tau sauvage 1N4R. Au contraire, dans le cas de la surexpression de la protéine Tau 3R sauvage ou de la protéine Tau 4R mutée en P332S, nous pouvons observer des structures de type corps de Pick indiquées par les flèches. Barres d'échelle = 50 μ m

Figure 24- Morphology of lesions observed with different Tau species. Representative \rightarrow

← images of AT8 immunolabelling in the CA1 layer (A/C/E) and the dentate gyrus (B/D/F) of animals injected with respectively Lentiviral vectors (LVs) encoding human WT 1N4R-Tau (A/B), human WT 1N3R-Tau (C/D) and human 1N4R-Tau mutated in P332S (E/F). We can observe NFT-like structures for the human WT Tau 1N4R. On the contrary, when 1N3R-WT or 1N4R-P332S are overexpressed, we can observe Pick body-like structures indicated by arrows. Scale bars = 50 μ m

En conclusion, nos résultats suggèrent, de manière cohérente avec ce qui est retrouvé dans les pathologies humaines, que la morphologie des inclusions neuronales de Tau est influencée par les isoformes de Tau ainsi que par la présence d'une mutation. Ainsi, il est possible de reproduire les inclusions de type corps de Pick observées chez les patients porteurs d'une mutation P332S.

IV- Discussion

Comme indiqué dans l'annexe 2, la plupart des modèles de tauopathies sont basés sur l'expression de protéines Tau mutées chez des animaux transgéniques. Les modèles montrant de la pathologie Tau avec l'expression de protéines Tau sauvages non tronquées sont très rares et restent bien souvent cantonnés au stade pré-tangle sans agrégation ni déficit cognitif (annexe 2, Götz & Ittner, 2008; Dujardin *et al*, 2015). De plus, il est important de noter les profondes différences qui existent dans : (1) l'évolution des tauopathies sporadiques comme la MA et des FTDP-17 dans lesquelles une mutation du gène MAPT est répertoriée ; (2) les propriétés tant moléculaires que cellulaires des formes mutées et sauvages de Tau (Hong *et al*, 1998; Dayanandan *et al*, 1999; Chang *et al*, 2008; DeTure *et al*, 2002a; Bretteville *et al*, 2009; Frost *et al*, 2009b). Ainsi, alors que la pathologie Tau dans la MA est un processus long et progressif, les modèles de surexpression de formes mutées de la protéine Tau entraînent une mort cellulaire très rapide (Jaworski *et al*, 2009).

Afin de déchiffrer les mécanismes qui ont lieu dans des tauopathies sporadiques et notamment la propagation de la pathologie Tau, nous avons développé un modèle *in vivo* de tauopathie sporadique. De manière intéressante, notre modèle présente un développement de pathologie progressif observé avec l'apparition de plusieurs marqueurs de pathologie : hyperphosphorylation, conformation anormale, agrégation et mort neuronale. Ces résultats ont été confirmés, par la suite, dans un modèle de PNH que nous avons développé en collaboration et dans lequel nous avons également réussi à mettre en évidence un processus inflammatoire en cours chez ces animaux. La perte neuronale massive observée dans notre groupe contrôle nous empêche malheureusement d'analyser correctement les résultats

comportementaux même s'il semble que les PNH surexprimant la protéine Tau présentent des déficits cognitifs.

Il est intéressant de constater que la pathologie Tau dans ces deux modèles est plus lente à se mettre en place chez les animaux surexprimant une protéine Tau sauvage que mutée. Ces résultats sont certainement dus aux propriétés pro-agrégatives des protéines mutées. Nous avons des résultats préliminaires qui, sans être conclusifs, nous portent à croire que les processus d'agrégation des protéines Tau sauvages et mutées sont différents. Ainsi, dans notre modèle nous observons que la protéine Tau sauvage est d'abord hyperphosphorylée, qu'elle change ensuite de conformation et qu'elle s'agrège finalement. Par contre, dans les modèles où une protéine Tau mutée est surexprimée, il semble que le changement de conformation est plus précoce, entraînant une agrégation mais l'hyperphosphorylation est, elle, secondaire (voir figure 4 de l'article 1, et Holmes *et al*, 2014). Ces résultats sont probablement dus à des mécanismes d'agrégation différents entre ces deux espèces de Tau. Il est probable que les mutations entraînent une mauvaise conformation qui induit un détachement des microtubules et une agrégation rapide sans que la phosphorylation ne soit nécessairement impliquée dans le processus. Par contre, dans le cas de la protéine Tau sauvage, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hyperphosphorylation est précoce, induisant un changement de conformation et consécutivement une agrégation. Nous reviendrons sur ce sujet plus tard dans cette thèse.

Enfin, nous avons montré que les isoformes de protéines Tau ainsi que les mutations du gène MAPT suffisent à induire des différences de morphologies des lésions Tau indiquant que ces différences sont dues aux propriétés intrinsèques des protéines. Nous pouvons par exemple penser que des propriétés proagréatives de protéines Tau 3R et mutées (Schweers *et al*, 1995; DeTure *et al*, 2002a) qui ont, de plus, une affinité plus faible pour les microtubules (Dayanandan *et al*, 1999; Butner & Kirschner, 1991) pourraient favoriser un rassemblement périnucléaire de ces protéines formant des structures particulières en forme de corps de Pick.

Finalement, en utilisant des technologies de vectorisation virale, nous avons réussi à créer des modèles de tauopathies qui résument de manière solide certains changements pathologiques qui ont lieu lors des tauopathies. Ces vecteurs, après injections intracrâniennes, diffusent peu et permettent donc d'induire une expression modérée et focale du transgène dans la zone ciblée, en l'occurrence ici la couche CA1 de l'hippocampe, une région affectée de manière précoce dans beaucoup de tauopathies dont la MA. Cette région est très caractérisée du point de vue connectivité en ayant notamment des connexions distantes avec

des régions comme les régions limbiques, l'amygdale, le cortex piriforme ou le subiculum (Cenquizca & Swanson, 2007). Ces connexions distantes vont nous permettre, par la suite, de tester la propagation de la protéine et de la pathologie Tau.

V- Chapter 0: modelling tauopathies - Supplementary information

The main objective of this part of the PhD project was to develop new models of tauopathies. We presented above an original rat model of primary tauopathy mediated by the injection of viral vectors. The advantages of viral vectors are that they can be used to test various constructs in different animals. In addition with the results presented above, we aimed to create a new model of non-human primate (NHP) but also a model of tauopathy 3R.

We developed the model of NHP in collaboration with the team of Dr Hantraye (MIRCent, UMR 9199, Fontenay-aux-Roses) aiming to reproduce our rat model in the NHP and to create a model for the validation of new tauopathies biomarkers and imagery tracers. We injected self-complementary Adeno-Associated Viral vectors (scAAVs) encoding the human Tau wild-type (n=4, scAAV2/9-CBA-hTau1N4R-WPRE), mutated in P301L (n=4, scAAV2/9-CBA-hTau1N4RP301L-WPRE) or encoding a GFP (Green Fluorescent Protein) with a stop codon preventing its translation named GFPnt (n=4, scAAV2/9-CBA-Stop-GFP-WPRE) into the CA1 layer of the hippocampus of NHP (figure 17).

Cognitive tests were performed showing no significant alteration of motivation (test VDT) or mnemonic capacities (test memory 30) of the primates. However, using the test DNMS, significant cognitive deficits can be seen in the three groups and more particularly in the GFPnt group suggesting hippocampal alteration (figure 18).

Indeed, a hippocampal atrophy can be seen with MRI imaging 8 months post-injection for animals injected with the GFPnt construct whereas, animals injected with Tau construct does not show any significant alterations (figure 19). TEP imagery was also realized showing a non-significant lowering of energetic metabolism seen with the radiotracer ^{18}F -Fluorodeoxyglucose. Also, a significant increase of neuroinflammation can be seen with the ligand ^{18}F -DPA714 (Boutin *et al*, 2013 ; figure 20). Finally, we tried to use a ligand developed to detect Tau pathology named T808 (Zhang *et al*, 2012; Ariza *et al*, 2015) but the high non-specific labelling observed excluded the proper analysis of the results. For TEP experiments, the control animals used are non-injected primates.

We also analysed the appearance of biomarkers in the Cerebrospinal Fluid (CSF) and

plasma of NHP and found by multiplex ELISA the appearance of several inflammatory markers in the biological fluids (table 2) confirming the TEP data showing that an inflammatory process is occurring. We also wanted to check the appearance of Tau proteins in these fluids but we were unable to show a significant increase in Tau concentration by ELISA.

Post-mortem, 12 months post-injection, we analysed by immunohistochemistry the brains of NHP showing AT8 (Tau hyperphosphorylation) and MC1 (Tau misfolding) immunolabelling in the entire hippocampus (figure 21). Interestingly, for both hTau1N4R and hTau1N4RP301L primates, NFTs can be evidenced with the antibody AT100 (Tau aggregation) (figure 22).

Consistently with TEP and ELISA results, an inflammatory reaction can be observed with a HLA-DR immunolabelling (figure 23). Although, no neuronal loss is present with a NeuN labelling except for the GFPnt expressing animals confirming the deleterious effect of this construct and clearly showing that this control group failed. New primates were injected with PBS in order to counteract this problem.

Using rats, we also wanted to overexpress different species of Tau in order to see if we were able to reproduce different morphologies of lesions. Therefore, we overexpressed in the hippocampus of rats the human 1N3R wild-type Tau but also human 1N4R-P332S, two constructs associated with Pick bodies in the human pathologies (Deramecourt *et al*, 2012, figures 10-11, annexe 3).

Although the overexpression of wild-type 1N4R Tau and P301L-1N4R Tau leads to the formation of NFT, it is interesting to notice that when constructs h1N3R and h1N4RP332S are overexpressed, Pick-like bodies are observed in the CA1 layer and the dentate gyrus (figure 24). In conclusion, it is possible to reproduce the phenotype of human pathologies by modifying the overexpressed Tau species. Thus, the morphology of neuronal inclusions seems to be influenced by Tau isoforms and mutation.

Chapitre 1 :

La propagation de la protéine Tau sauvage, mécanisme physiologique ou reflet de la pathologie ?

I. Introduction

Depuis l'existence même d'un mécanisme de propagation de la pathologie Tau dans les tauopathies jusqu'à la compréhension des mécanismes sous-jacents, les problématiques concernant la propagation de la protéine Tau sont multiples. A ce jour, ces questions ont été partiellement abordées dans la littérature démontrant notamment l'existence d'un mécanisme de transfert de la protéine Tau *in vitro* (Frost *et al*, 2009a), d'une transmissibilité de la pathologie (Clavaguera *et al*, 2009) ainsi que de mécanismes de « seeding » (Friedhoff *et al*, 1998; Holmes *et al*, 2014). Cependant, l'analyse de ces études se heurte à l'utilisation de modèles souvent contestables. En effet, les modèles transgéniques permettent difficilement, dans une cellule donnée, de faire la part des choses entre propagation et expression du transgène. Certains auteurs présentent des modèles avec une expression localisée dans le cortex entorhinal mais une fuite du transgène est régulièrement rapportée (de Calignon *et al*, 2012; Yetman *et al*, 2015). Nous pouvons également noter qu'étant donné la difficulté de modéliser la pathologie Tau avec une protéine Tau sauvage, la grande majorité des études portant sur la propagation ou le seeding *in vivo* de la protéine Tau utilise des protéines Tau mutées et/ou tronquées (voir Dujardin *et al*, 2015 en annexe 2). Nous pouvons nous demander la pertinence d'utiliser ces espèces de Tau étant donné les différences importantes qui ont été décrites dans leurs comportements moléculaire et cellulaire. De plus, les pathologies dans lesquelles une évolution de la pathologie Tau a été décrite sont des pathologies sporadiques sans mutation du gène MAPT. Dans ce cadre, le modèle de tauopathies chez le rat que nous avons développé est une alternative intéressante. En effet, il utilise une protéine Tau sauvage non tronquée et l'expression focale du transgène permet l'analyse de la progression pathologique depuis le site d'injection jusqu'aux zones connectées. Nous avons donc voulu

comprendre s'il était possible d'observer une évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau depuis le site d'initiation de la pathologie jusqu'à des régions distantes. Ensuite, pour comprendre si cette progression peut être expliquée par un transfert de cellule en cellule de la protéine Tau, elle-même, nous avons mis au point de nouvelles constructions codant pour la protéine Tau 1N4R sauvage ou mutée assortie d'une étiquette peptidique, appelée V5. Cette étiquette nous permet de distinguer les protéines Tau humaines surexprimées des protéines endogènes du rat et de nous affranchir des problèmes de spécificités des anticorps dus à l'homologie de séquences entre les protéines Tau humaines et murines.

II. Article 2 : Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies

REFERENCE: Dujardin S, Lécolle K, Caillierez R, Bégard S, Zommer N, Lachaud C, Carrier S, Dufour N, Aurégan G, Winderickx J, Hantraye P, Déglon N, Colin M & Buée L (2014b) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 14

AUTHORS: Simon Dujardin^{1,2}, Katia Lécolle^{1,2}, Raphaëlle Caillierez^{1,2}, Séverine Bégard^{1,2}, Nadège Zommer^{1,2,3}, Cédric Lachaud^{1,2}, Sébastien Carrier^{1,2}, Noëlle Dufour^{4,5}, Gwennaëlle Aurégan^{4,5}, Joris Winderickx⁶, Philippe Hantraye^{4,5}, Nicole Déglon^{4,5,7}, Morvane Colin^{1,2,3*†} and Luc Buée^{1,2,3*†}

¹Inserm, UMR837, Place de Verdun, 59045 Lille, France. ²Faculté de Médecine, JPArc, Université Lille 2, Place de Verdun, 59045 Lille, France. ³CMRR, CHR, 59037 Lille, France. ⁴Atomic Energy Commission (CEA), Institute of Biomedical Imaging (I2BM), Molecular Imaging Research Center (MIRcen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. ⁵CNRS, URA2210, Molecular Imaging Research Center (MIRcen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. ⁶Functional Biology, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31, box 2433, B-3001 Heverlee, Belgium. ⁷Present address: Department of Clinical Neurosciences (DNC), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LMCN), Lausanne University Hospital (CHUV), CH-1011 Lausanne, Switzerland. * Correspondence: morvane.colin@inserm.fr; luc.buee@inserm.fr, †Equal contributors

ABSTRACT:

Background: In sporadic Tauopathies, neurofibrillary degeneration (NFD) is characterised by the intraneuronal aggregation of wild-type Tau proteins. In the human brain, the hierarchical pathways of this neurodegeneration have been well established in Alzheimer’s disease (AD) and other sporadic tauopathies such as argyrophilic grain disorder and progressive supranuclear palsy but the molecular and cellular mechanisms supporting this progression are yet not known. These pathways appear to be associated with the intercellular transmission of pathology, as recently suggested in Tau transgenic mice. However, these conclusions remain ill-defined due to a lack of toxicity data and difficulties associated with the use of mutant Tau.

Results: Using a lentiviral-mediated rat model of hippocampal NFD, we demonstrated that

III. Résultats complémentaires, les protéines Tau mutées sont aussi transférées dans des zones distantes

Dans l'article précédent, nous montrons que la pathologie induite par la surexpression d'une protéine Tau sauvage évolue dans des régions distantes au contraire de la pathologie induite par la surexpression d'une protéine mutée. A la suite de ces résultats, nous avons cherché à comprendre ce qui pourrait expliquer ces différences de progression spatio-temporelle. Nous avons donc émis l'hypothèse que les protéines Tau mutées, à l'inverse des protéines Tau sauvages ne seraient pas transférées de cellule en cellule sur de longues distances. En utilisant les mêmes procédures que dans l'article précédent, nous avons injecté des animaux avec des vecteurs lentiviraux codant pour une protéine Tau mutée en P301L contenant l'étiquette V5, construction non utilisée dans l'article précédent. Nous avons réalisé les mêmes marquages par immunohistochimie (marquages V5, AT8, MC1 et AT100) montrant d'abord que, 8 mois post-injection, l'étiquette V5 ne modifie pas la progression pathologique (figure 25). Nous avons réalisé alors un marquage V5 dans des zones distantes du site d'injection dans lesquelles les protéines Tau sauvages sont transférées et notamment dans les neurones de la couche granulaire du bulbe olfactif. De manière inattendue, alors que les épitopes de pathologie restent restreints autour du site d'injection, il s'avère que les protéines Tau mutées, comme les protéines Tau sauvages sont transférées depuis le site d'injection jusqu'à des zones très éloignées du site d'injection (figure 26).

Ces résultats surprenants nous ont amené à envisager d'autres hypothèses et notamment la possibilité que le tag V5 (ou la partie amino-terminale de la protéine) pouvait être clivé et ainsi perdre sa capacité à acquérir des épitopes pathologiques. Nous avons donc injecté une série de rats avec des vecteurs lentiviraux codant pour des protéines Tau sauvages ou mutées assorties de l'étiquette V5 pour faire une analyse biochimique. Cinq mois après injection, nous avons disséqué chez ces rats la GrO et l'avons analysée en western blot pour déterminer la nature des espèces de Tau transférées. Les résultats présentés dans la figure 27 suggèrent que les protéines Tau transférées dans la GrO sont d'un poids moléculaire apparent similaire à la protéine Tau totale non clivée (immunomarquages V5 et ADx215^{**} ; figure 27 A-B). De plus, confirmant les résultats présentés dans l'article ci-dessus, ces protéines ne semblent pas phosphorylées notamment sur la tyrosine 18 comme montré par l'anticorps ADx215 ainsi que

^{**} L'anticorps ADx215 reconnaît spécifiquement la protéine Tau humaine dans sa partie aminoterminal acides aminés 17-25, déphosphorylée sur la tyrosine 18 (Rosseels *et al*, 2015).

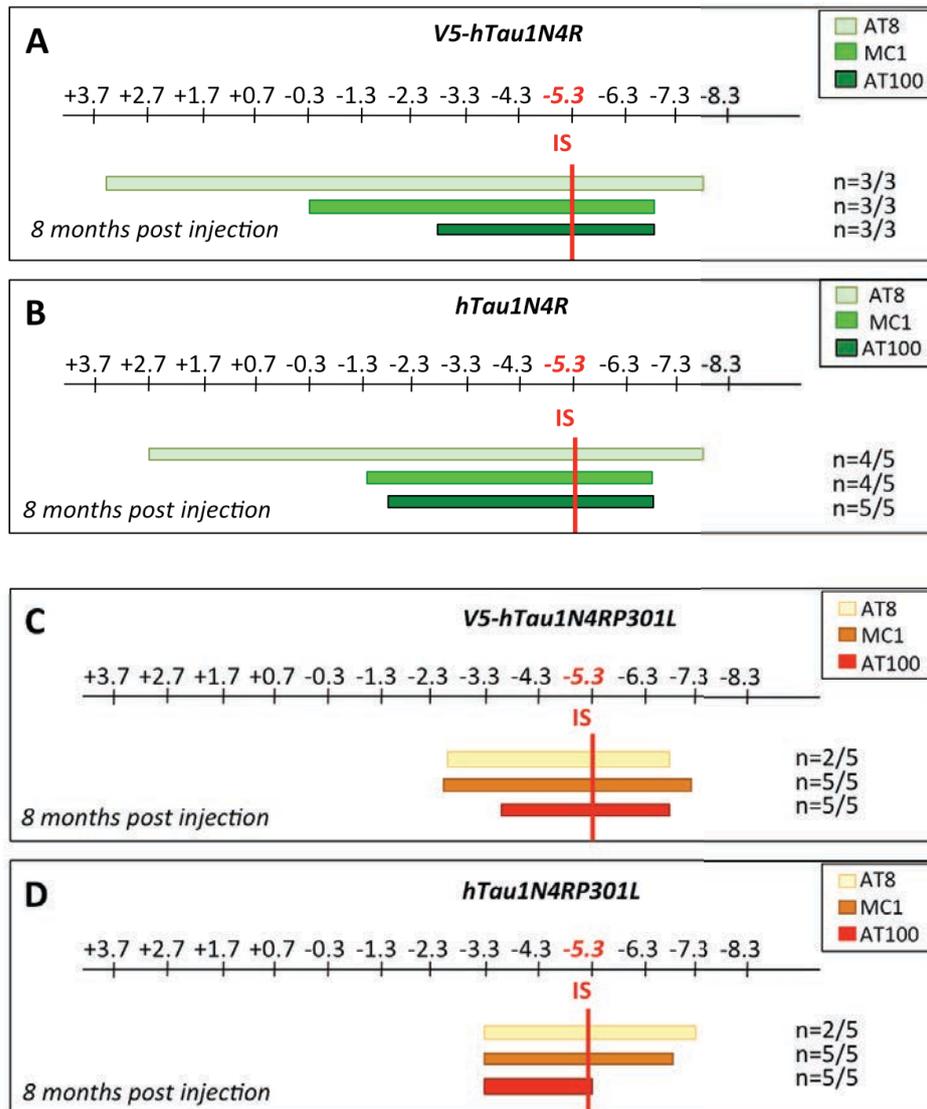


Figure 25- L'étiquette V5 n'a pas d'influence sur le développement de la pathologie Tau. Que ce soit pour la protéine Tau sauvage (A-B) ou mutée (C-D), l'ajout de l'épitope V5 (A, C) n'a pas d'influence sur le développement spatial de la pathologie Tau 8 mois post-injection. Des vecteurs viraux codant pour la protéine Tau humaine V5-hTau1N4R (n = 3, sacrifiés 8 mois post-injection) (A), hTau1N4R (n = 5, sacrifiés 8 mois post-injection) (B), V5-hTau1N4RP301L (n = 5, sacrifiés 8 mois post-injection) (C), hTau1N4RP301L (n = 5, sacrifiés 8 mois post-injection) (D) ont été injectés de manière bilatérale dans la couche CA1 de l'hippocampe de rats wistar. Après sacrifice, une analyse immunohistochimique a été réalisée sur le cerveau entier avec les anticorps primaires AT8, MC1 et AT100. Parmi les rats immunoréactifs, les coordonnées les plus rostrales et les plus caudales marquées pour chaque anticorps ont été déterminées sur chaque cerveau.

Figure 25- The tag V5 has no influence on the Tau pathology development. Whether for WT Tau (A-B) or mutated Tau (C-D), the epitope V5 does not influence the spatial development of Tau pathology 8 months post-injection. Viral vectors encoding human Tau protein V5-hTau1N4R (n = 3, sacrificed 8 months post-injection) (A), hTau1N4R (n = 5, sacrificed 8 months post-injection) (B), V5-hTau1N4RP301L (n = 5, sacrificed 8 months post-injection) (C), hTau1N4RP301L (n = 5, sacrificed 8 months post-injection) (D) were bilaterally injected in the CA1 layer of the hippocampus of Wistar rats. After sacrifice, an immunohistochemical analysis with antibodies AT8, MC1 and AT100 was realized on the entire brain. Within the immunoreactive rats, the rostral-most and caudal-most coordinates labeled for each antibody were determined on each brain.

sur la sérine 422, un des épitopes majeurs de phosphorylation dans la MA (figure 27 C). Nous avons voulu déterminer si la protéine Tau est transférée sous forme d'oligomères, nous avons essayé de réaliser un western blot avec un anticorps spécifique des oligomères de Tau développé par l'équipe du Dr Kaye (Department of Neurology, University of Texas, Galveston, Lasagna-Reeves *et al*, 2012a; 2012b) : l'anticorps T22. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre au point cet anticorps au sein de notre laboratoire. Il serait intéressant de pouvoir tester d'autres anticorps pour obtenir des résultats conclusifs. Ces résultats en biochimie restent malgré tout préliminaires et nécessiteraient une caractérisation plus importante avec notamment d'autres outils immunologiques.

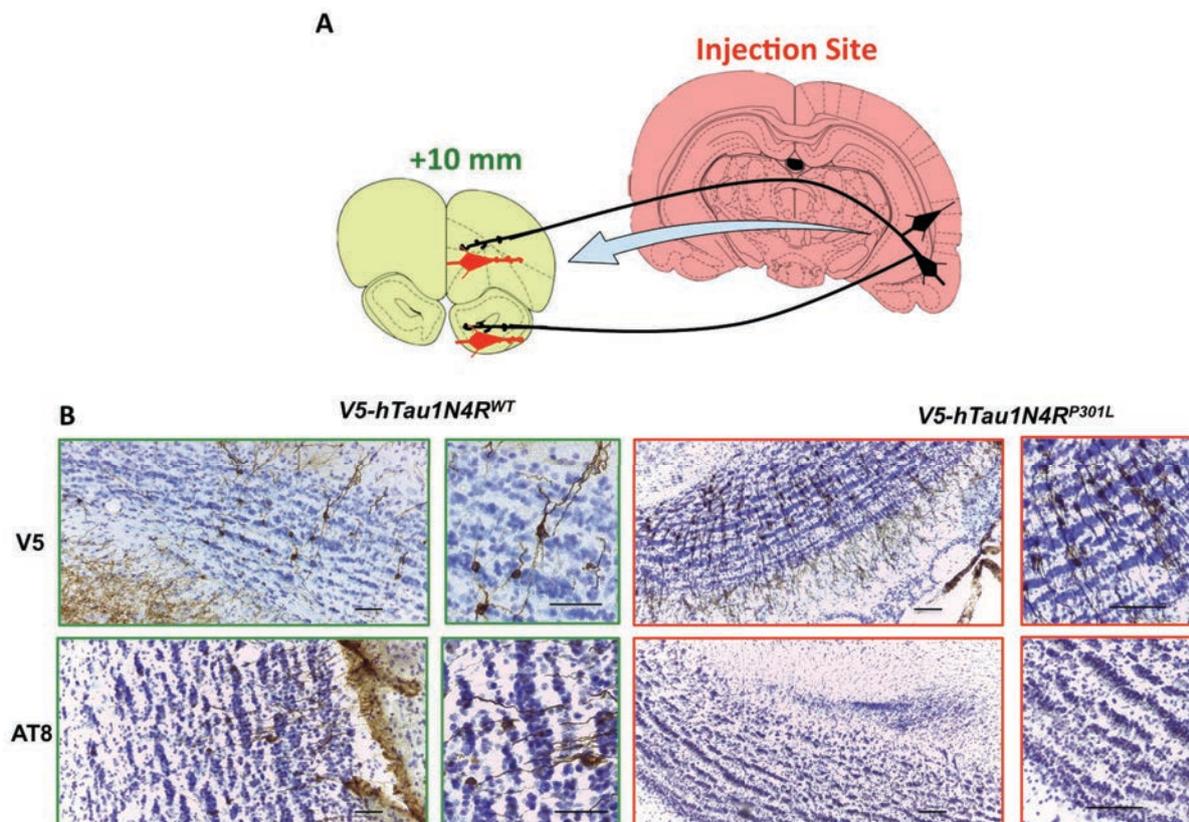


Figure 26- Les protéines Tau-V5 sauvages et mutées sont transférées depuis le site d'injection jusqu'à des sites distants. A- représentation schématique du site d'injection des vecteurs lentiviraux (rouge) et des zones secondaires du bulbe olfactif (vert). B- Des vecteurs viraux codant pour la protéine Tau humaine V5-hTau1N4R, et V5-hTau1N4RP301L ont été injectés de manière bilatérale dans la couche CA1 de l'hippocampe de rats wistar. Après sacrifice, une analyse immunohistochimique a été réalisée sur le cerveau entier avec les anticorps primaires V5 et AT8. Des photographies représentatives de la couche de cellules granulaires du bulbe olfactif (GrO) sont présentées ici montrant la présence importante de neurones V5 positifs dans la GrO des rats surexprimant la protéine Tau sauvage et la protéine Tau mutée. Par contre, si les neurones AT8-positifs sont abondants chez les rats surexprimant la protéine sauvage, aucun ne peut être détecté chez les rats surexprimant la protéine mutée. Barres d'échelle = 100 µm

Figure 26- V5 WT and mutated Tau proteins are transferred from the injection site to distant and connected brain areas. A- schematic representation of the LVs injection site (red) and the secondary olfactory connected areas (green). B- Viral vectors encoding human Tau V5- →

← 1N4R and V5-hTau1N4RP301L were bilaterally injected in the CA1 layer of the hippocampus of wistar rats. After sacrifice, an immunohistochemical analysis with antibodies V5 and AT8 was realized on the entire brain. Representative images of the granular cells of the olfactory bulb (GrO) are presented here, showing the substantial presence of V5-positive neurons into the GrO of rats overexpressing the human WT and mutated Tau protein. Although the AT8-positive neurons are abundant in rats overexpressing the human WT Tau, none can be detected in rats overexpressing the human mutated Tau. Scale bars = 100 μ m

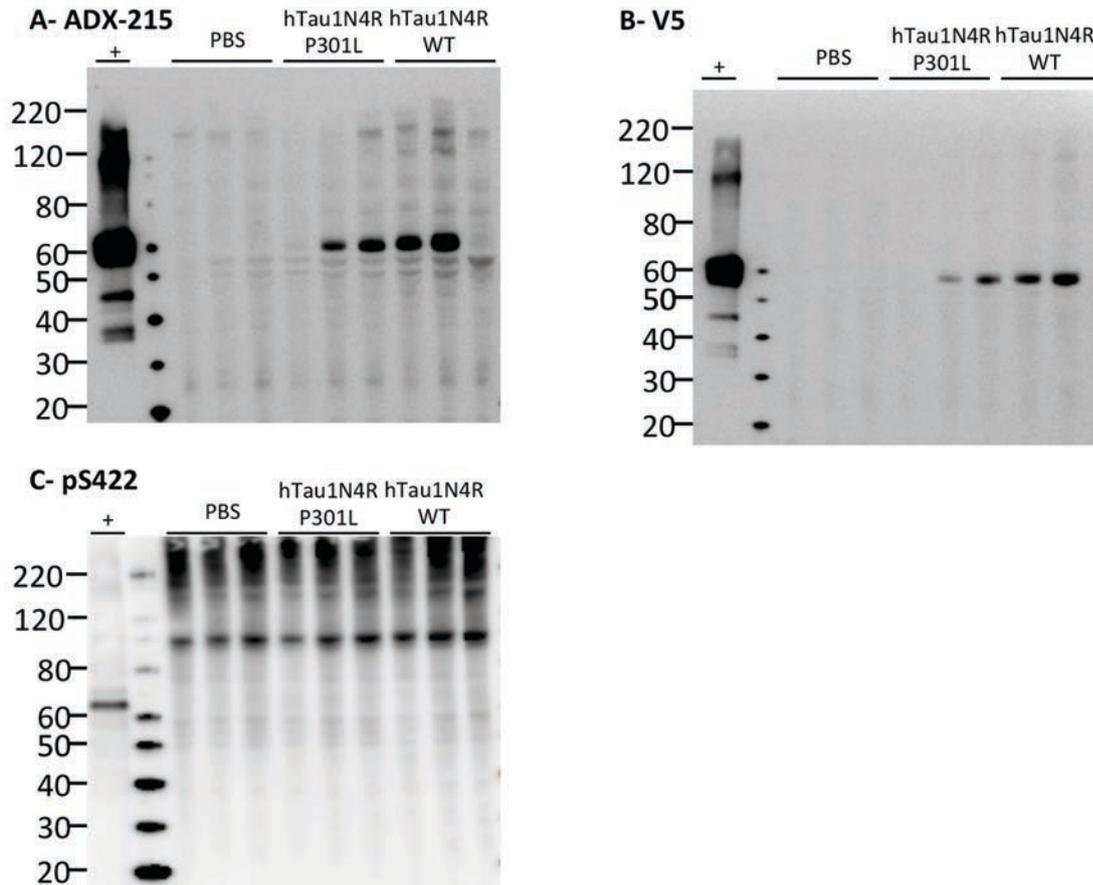


Figure 27- Analyse biochimique des protéines Tau dans la GrO. Les GrO de 9 rats injectés respectivement dans l'hippocampe avec du PBS (n=3), des vecteurs viraux codant pour la protéine Tau humaine V5-hTau1N4RP301L (n=3), et V5-hTau1N4R (n=3) ont été analysés en western blot avec un anticorps anti Tau ADx215 (A), un anticorps anti épitope V5 (B) et un anticorps dirigé contre la sérine 422 phosphorylée (C). Les conditions de western blot sont décrites dans l'article N°1. Le témoin positif (+) utilisé est un lysat de cerveau de souris transgéniques Thy-Tau22.

Figure 27- Biochemical analysis of Tau proteins into the GrO. GrO of 9 rats injected with PBS (n=3), LVs encoding human Tau V5-hTau1N4RP301L (n=3), et V5-hTau1N4R (n=3) were analyzed by western blotting with the antibody ADx215 raised against Tau (A), an antibody against the epitope V5 (B) and an antibody raised against the phosphorylated serine 422 (C). The western blot conditions are described in the article N°1. The positive control (+) is a brain lysate of Thy-Tau22 transgenic mice.

IV. Discussion

Prenant avantage d'une surexpression localisée de la protéine Tau dans l'hippocampe, nous avons démontré de manière conclusive *in vitro* mais aussi pour la première fois *in vivo* que les protéines Tau sont transférées depuis des neurones primaires vers des zones secondaires anatomiquement connectées. Les données à notre disposition semblent montrer que ce transfert a lieu depuis l'axone des neurones primaires jusqu'au soma des neurones secondaires confirmant ainsi certaines données récentes (Calafate *et al*, 2015). Cependant, même si les présomptions sont importantes, il est prématuré dans notre cas de parler de véritable transfert transsynaptique.

Comme précédemment décrit, dans ce modèle, un développement progressif de la pathologie Tau est observable au site d'injection des vecteurs lentiviraux. De manière vraiment intéressante, nous pouvons observer une véritable évolution spatio-temporelle de la pathologie suivant les voies neuroanatomiques et atteignant des zones dans lesquelles aucune expression de la protéine Tau humaine n'est détectable.

Il est intéressant de constater qu'alors que les protéines Tau sauvages comme mutées sont transférées dans des régions extrêmement éloignées du site d'injection (figure 26), la pathologie Tau médiée par les protéines sauvages évolue dans des régions distantes alors que celle médiée par les protéines mutées reste limitée aux abords du site d'initiation (figure 25). Ces données semblent indiquer que notre modèle d'étude chez le rat est probablement un modèle bivalent qui (1) confirme et modélise une propagation physiologique de la protéine Tau, comme suggéré par plusieurs études (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a), et (2) modélise l'évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau médiée par des protéines Tau sauvages. Ce modèle suggère donc que plusieurs espèces de protéines Tau entrent en jeu : (1) des espèces, en grande majorité déphosphorylées et pas forcément pathologiques, capables de se déplacer de cellule à cellule et au contraire (2) des espèces responsables de la pathologie Tau. Il est probable que pour les protéines Tau mutées, les espèces responsables de la pathologie ne soient pas capables de se déplacer et de répandre la pathologie au contraire des protéines Tau sauvages. Encore une fois, les différences de comportements biochimiques des protéines Tau sauvages et mutées sont probablement impliquées dans ces phénomènes avec une protéine Tau mutée plus susceptible d'adopter une conformation pathologique par elle-même que les protéines sauvages.

Au sein des tauopathies sporadiques humaines, il existe de grandes différences en terme

d'évolution de la pathologie Tau entre les tauopathies 3R et les tauopathies 4R. A la suite de cette étude, nous nous sommes donc demandés si des différences de propagation de la pathologie pouvaient exister entre des espèces de protéines Tau 3R et des espèces 4R.

V. Chapter 1: propagation of wild-type Tau, physiological mechanism or mirror of the pathology - Supplementary information

In the previous article, we showed that Tau pathology induced by the overexpression of wild-type Tau is propagating in distant brain areas, contrary to the overexpression of mutated Tau. Following these results we wondered if the difference is due to a differential transfer of those two species. Using the same procedures described above, we injected LVs encoding hTau1N4RP301L-V5 and realized the same immunolabelling with the antibodies V5, AT8, MC1 and AT100. We first showed that the V5 tag was not modifying the progression of Tau pathology (figure 25). Then, using an antibody raised against the tag V5, we demonstrated that mutated Tau, are transferred in distant brain areas similarly to wild-type Tau (figure 26). These surprising results led us to other hypothesis and we particularly wondered if the transferred Tau proteins might be truncated, losing their ability to acquire the pathological properties. We injected rats with LVs encoding wild-type or mutated Tau proteins and we analysed their GrO 5 months later by western blotting. In figure 27, we can see that the molecular weight of transferred Tau proteins is similar to full-length Tau suggesting that transferred Tau are not truncated (figure 27 A-B). Moreover, our results are showing that transferred Tau proteins are not phosphorylated particularly on residues Y18 and S422 (figure 27 A/C). This biochemical data is however very preliminary and would benefit from further investigations.

Chapitre 2 : Mécanismes de propagation de la protéine Tau, depuis les espèces moléculaires jusqu'aux vésicules extracellulaires.

I. Différents isoformes de Tau, différentes évolutions pathologiques ?

I.1. Introduction

Chez l'humain, une partie de l'hétérogénéité des tauopathies est liée à la composition moléculaire des lésions Tau. Ainsi, alors que 6 isoformes de protéines Tau existent dans le cerveau humain adulte, dans certaines tauopathies, seuls certains isoformes s'agrègent. On peut ainsi opposer des tauopathies dans lesquelles seuls les isoformes avec 3 domaines de liaison aux microtubules s'agrègent à l'instar de la maladie de Pick (tauopathies 3R) avec des tauopathies dans lesquelles les isoformes avec 4 domaines de liaison aux microtubules s'agrègent (tauopathies 4R). Selon les tauopathies, les évolutions de la pathologie dans le système cérébral sont différentes. Il est d'ailleurs intéressant de constater que les pathologies dans lesquelles une évolution stéréotypée de la DNF a été décrite (MA, PSP, AGD) sont toutes des tauopathies 4R sauf la MA pour laquelle les six isoformes de protéines Tau s'agrègent. A l'instar de ce que nous pouvons observer pour les protéines Tau mutées en P301L, nous avons donc émis l'hypothèse que ces différences pourraient être dues en partie à des comportements disparates en terme de propagation de la pathologie Tau selon les isoformes. En utilisant notre modèle de rat, maintenant bien décrit, nous avons donc analysé la propagation de la pathologie Tau induite par des espèces 4R, sauvages ou mutées, ainsi que des espèces 3R, sauvages ou mutées. Notre étude démontre que, dans notre modèle, la pathologie Tau induite par une surexpression des protéines Tau 3R et/ou mutées en P332S (La mutation P332S a l'avantage d'être présente sur les isoformes 3R et 4R au contraire de la mutation P301L.) est restreinte au site d'injection et propage significativement moins loin que la pathologie Tau induite par une surexpression des protéines Tau 4R sauvages. Ces résultats sont présentés dans l'article suivant qui est en cours de soumission.

I.2. Article 3, Differential spreading of 3R and 4R Tau isoforms in the rat brain

AUTHORS: Simon Dujardin Ph.D.^{1,2}, Séverine Bégard M.Sc.^{1,2}, Cédric Lachaud M.Sc.^{1,2}, Raphaëlle Caillierez M.Sc.^{1,2}, Virginie Zimmer M.Sc.^{4,5}, Nicole Déglon Ph.D.^{4,5}, Susanna Schraen-Maschke Pharm.D., Ph.D.^{1,2,6}, Florence Pasquier M.D., Ph.D.^{3,7}, Vincent Deramecourt M.D., Ph.D.^{3,7}, Luc Buée Ph.D.^{1,2,3,*} and Morvane Colin Ph.D.^{1,2,3,*}

¹*Inserm UMR-S 1172, JPArc, 1 rue Polonovski, 59045 Lille, France*

²*Université Lille, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille, France*

³*Lille University Hospital, Memory Clinic, 59037 Lille France*

⁴*Lausanne University Hospital (CHUV), Department of Clinical Neurosciences (DNC), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LMCN), CH-1011 Lausanne, Switzerland*

⁵*Lausanne University Hospital (CHUV), Neuroscience Research Center (CRN), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LMCN), CH-1011 Lausanne, Switzerland*

⁶*Lille University Hospital, Center for Biology and Pathology, Lille, France*

⁷*Inserm UMR- S 1171, 59045 Lille, France*

** Equal contributors*

ABSTRACT:

Human brain contains Tau isoforms with 3 or 4 microtubule-binding domains that differentially aggregate in tauopathies. In sporadic AGD and PSP, the aggregates are composed of four-repeat Tau and exhibit a hierarchical progression, whereas the PiD aggregates, only containing three-repeat Tau, lead to rapid neuronal loss as observed in rare familial tauopathies (FTDP-17). Using animal models, we demonstrated that isoforms and mutations influence Tau spreading. Whereas three-repeat and mutant Tau display a restricted spreading, four-repeat Tau isoforms exhibit a much wider and hierarchical spreading of Tau pathology. These results, consistent with human pathology may explain heterogeneous phenotypes associated with tauopathies.

INTRODUCTION:

The tauopathies represent a heterogeneous group of diseases characterised by the aggregation of Tau proteins into specific lesions. In the human brain, six Tau isoforms that comprise 3 (3R) or 4 (4R) microtubule binding regions are generated by alternative splicing from a single gene, *MAPT* (microtubule associated protein), located on chromosome 17. An imbalance in the 3R/4R ratio may contribute to the pathological process of tauopathies. More than 90% of tauopathies are sporadic and mutations are responsible for autosomic dominant

forms of frontotemporal dementia with or without Parkinsonism (FTDP-17)^{1,2}.

The sporadic tauopathies, such as Alzheimer's disease (AD)³, progressive supranuclear palsy (PSP)^{4,5}, corticobasal degeneration and argyrophilic grain disease (AGD)⁶, are associated with a specific, progressive and hierarchical appearance of Tau aggregation. In contrast, in FTDP-17 or Pick's disease (PiD), for example, no pathological staging has been described so far. Although all tauopathies are characterised by intracellular Tau aggregates, their Tau protein isoform composition varies. All six Tau isoforms are aggregated in several diseases, such as AD, whereas the preferential aggregation of either the 3R or 4R isoforms occurs in other diseases, such as PiD and PSP, respectively⁷. Recent data have demonstrated that Tau is physiologically secreted^{8,9}; however, whether this secretion is part of the pathological process remains unclear.

Using our well-described rat model of tauopathies^{10,11}, we investigated whether Tau isoforms, including the FTDP-17 mutation, could support a differential progression of phosphoTau protein throughout the brain. In the present study, we demonstrate that while phospho-3R Tau is a poorly propagative species, phospho-4R Tau mediates a long-distance spreading of Tau pathology, which is associated with an increase in Tau secretion in the cerebrospinal fluid (CSF). Moreover, Tau pathology was focused and narrowly constricted when associated with the mutant forms of the protein (3R or 4R).

MATERIALS & METHODS

Viral vectors- As previously described, each lentiviral vectors batches (LVs) are subjected to control quality tests before injection in the rat brain including: the particles concentration, the absence of competent retroviruses and their ability to express Tau at similar level in cell cultures (cell lines and primary neurons coming from rat hippocampus)^{10,12}.

Animals- The animals were purchased from Janvier Laboratories. All animal experiments were performed in compliance with European Community regulations and Swiss animal welfare laws and after the agreement of the local Animal Resources Committee with authorization numbers from the French 'Comité d'éthique en expérimentation animale du Nord Pas-de-Calais': CEEA 342012 and the Swiss Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud: VD 2487..

Stereotaxic injections, CSF sampling and sacrifice procedures- The rats were housed and injected with PBS or the LVs¹¹ that encoded hTau1N4R, hTau1N4R-P332S, hTau1N3R or hTau1N3R-P332S. Eight months post-injection, the animals were anesthetised with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and positioned on a stereotaxic frame. The CSF was

sampled inside the cisterna magna four months post-LV delivery. The animals were anaesthetised (8% chloride hydrate) and perfused before fixed using 4% PFA for 20 min. The brains were immediately removed, fixed overnight in 4% PFA, placed in 20% sucrose for one week and frozen until further use.

CSF from patients and controls- CSF were obtained as previously described. The AD and control CSF are have been previously described¹³.

Total Tau measurements- The total Tau concentrations in rat or human CSF were determined using the Innostest hTAU-Ag sandwich ELISA kit (Fujirebio, Belgium).

Immunohistochemistry- The immunohistochemistry procedures have been previously described¹¹. Free-floating coronal brain sections were incubated with the monoclonal antibody AT8 (Thermo Scientific). The labelling was amplified with the application of the ABC kit (Vector). The brain sections were counter-stained with cresyl violet.

Statistical assays- The P values were determined using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. The differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

RESULTS:

In a previous study in a rat model of tauopathies, we highlighted the differences in the spreading of the hyperphosphorylated, misfolded and aggregated hTau1N4R and hTau1N4R-P301L¹¹. Here, LVs that encoded hTau1N4R, hTau1N3R or a mutation associated with fronto-temporal dementia (FTD), hTau1N3R-P332S or hTau1N4R-P332S¹² were injected in the CA1 of male Wistar rats. The P332S mutation, similarly to the P301L¹¹, is located in the repeated PGGG motif but within the third repeat found in both 3R and 4R Tau isoforms¹². The AT8 immunoreactivity was analysed eight months post-injection to determine the spatiotemporal progression of the Tau hyperphosphorylation throughout the rat brain. As previously described¹¹, in the LV hTau1N4R injected rats, the AT8 immunoreactivity was identified in secondary cellular bodies (Fig 1 and 2, red stars) in several connected regions (i.e., the granular layer of the olfactory bulb) as far as 10 mm away from the injection site (IS). Conversely, compared with h1N4R, all other isoforms/mutants present an AT8 immunoreactivity that is restricted to the vicinity of the IS (Fig 1, $p < 0.05$ for h1N4R-P332S, $p < 0.05$ for h1N3R and $p < 0.001$ for h1N3R-P332S). These observations extend our conclusions obtained with P301L¹¹ to another FTDP-17 mutation.

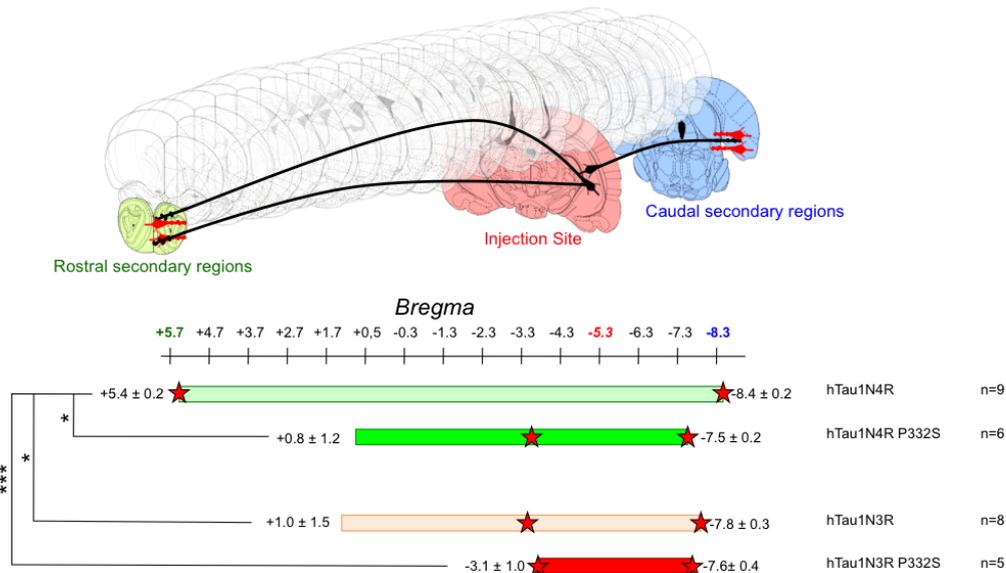


Figure 1: Tau species modulate Tau pathology progression. LVs that encoded hTau1N4R, hTau1N4RP332S, hTau1N3R or hTau1N3RP332S were bilaterally injected into the CA1 layer of the rat brains. Eight months post-LV injection, the animals were sacrificed, and the whole brain was processed for immunohistochemical analysis using AT8 phosphorylated Tau antibodies. Among the positive rats, the rostral most and caudal most brain coordinates (from bregma), labelled AT8, were determined for each brain. The figures represent the mean values \pm SEM of the rostral most and caudal most brain coordinates. The Mann-Witney U significance is indicated in the figure (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). The last cell bodies labelled by AT8 are indicated by the red stars. These data demonstrated that Tau hyperphosphorylation is restricted to the vicinity of the IS when mutant or 3R Tau is overexpressed. Conversely, hTau1N4R spreads throughout the brain.

Our group and other groups have previously demonstrated that Tau is secreted in biological fluids, such as CSF in a free^{8,9} or vesicular form¹⁴⁻¹⁶. Here, we investigated whether Tau secretion from the neurons to the extracellular medium might be influenced by the isoforms and/or MAPT mutations. To address this specific point, we sampled the rat CSF four months post-LV injection to determine the total Tau amount via ELISA. We demonstrated that the over accumulation of human 1N4R-Tau in the rat brains led to an increase in the total Tau identified in the CSF compared with the PBS-injected rats (Fig 3A, $p < 0.05$). More interestingly, the total Tau level is lower in the CSF obtained from the rats that overexpress hTau1N3R, hTau1N4R-P332S or hTau1N3R-P332S compared with the rats that overexpress hTau1N4R. Furthermore, we assessed the CSF concentrations of total Tau in a cohort of patients with dementia and healthy controls (Fig 3B, AD (3R+4R), PSP/CBD (4R) and FTDP-17 (3 or 4R)) recruited from Lille University Hospital Memory Clinic. As expected, a higher level of total Tau was identified in the AD group¹⁷; however, the levels identified in the PSP/CBD and FTDP-17 groups are comparable to the 4R or FTDP-17 rat groups respectively (compare Fig 3A to Fig 3C).

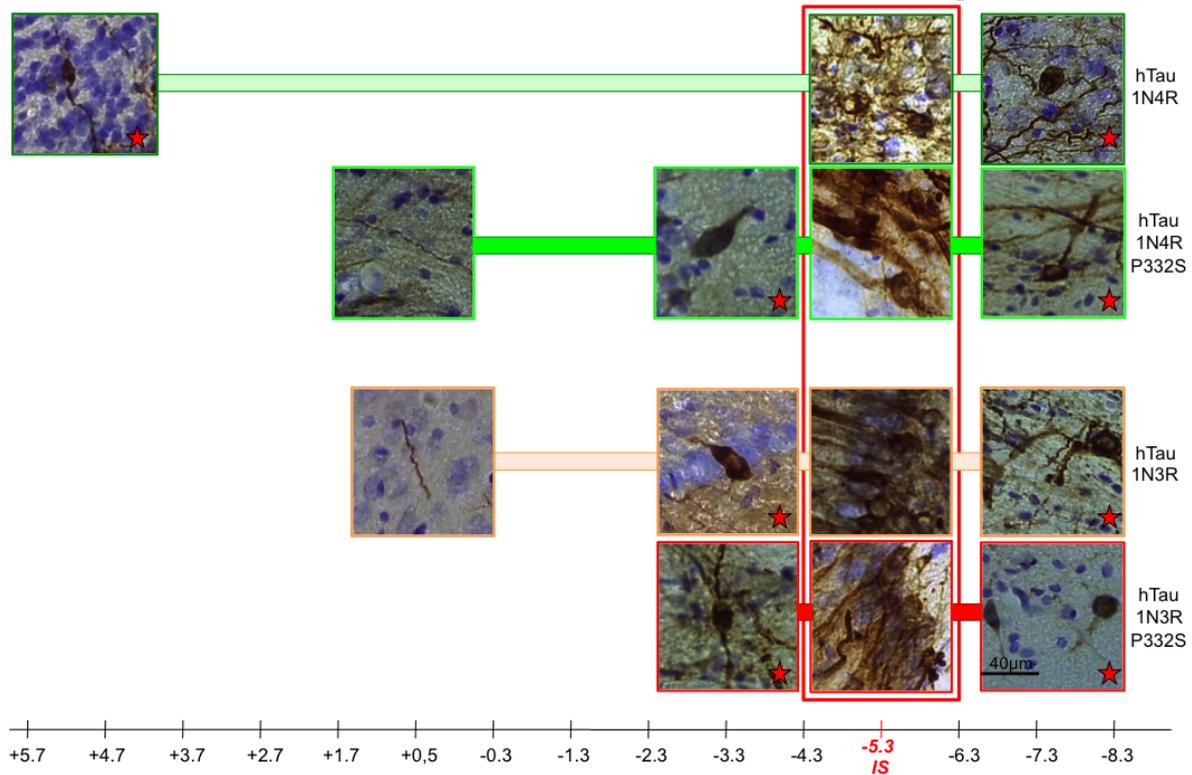


Figure 2: Mutant and WT-Tau associated pathology progression. The AT8-Tau immunoreactivity is illustrated from figure 1 via the addition of the lesion images on the phospho-Tau spreading pathway. The last cellular bodies that are AT8 positive (red star) specifically support the phospho-Tau pathology transfer. The scale bar is indicated in the figure.

DISCUSSION:

Whereas a pathological staging of Tau lesions has been described in AD (3R and 4R), PSP (4R) and AGD (4R), this staging has not been demonstrated in the FTDP-17 or 3R-associated tauopathies, such as PiD, in which the lesions are mainly restricted to the fronto-temporal brain regions. These observations led us to investigate the impact of the Tau isoforms and mutations on Tau pathology spreading. The differences we observed between WT and mutant Tau (Fig 1 and 2) are likely reflecting intrinsic properties of these Tau proteins. Mutant Tau proteins exhibit better nucleation and more rapid fibrillogenesis compared with WT Tau¹⁸. Furthermore, FTDP-17 mutants, such as P332S and P301L, exhibited poor binding to the microtubules¹², which results in cytoskeleton damage that may alter the progression of the pathology throughout the brain. In addition, the tendency of 3R Tau to form oligomers and polymers, in contrast to 4R Tau, has been previously demonstrated *in vitro* by Mandelkow's group¹⁹. The cysteine (C322) present in 3R Tau enables the formation of intermolecular bridges that may more rapidly initiate the Tau conversion/aggregation. Conversely, the two cysteines (C291, C322) present in 4R Tau mainly drive the formation of intramolecular bridges, which then most likely slow down the

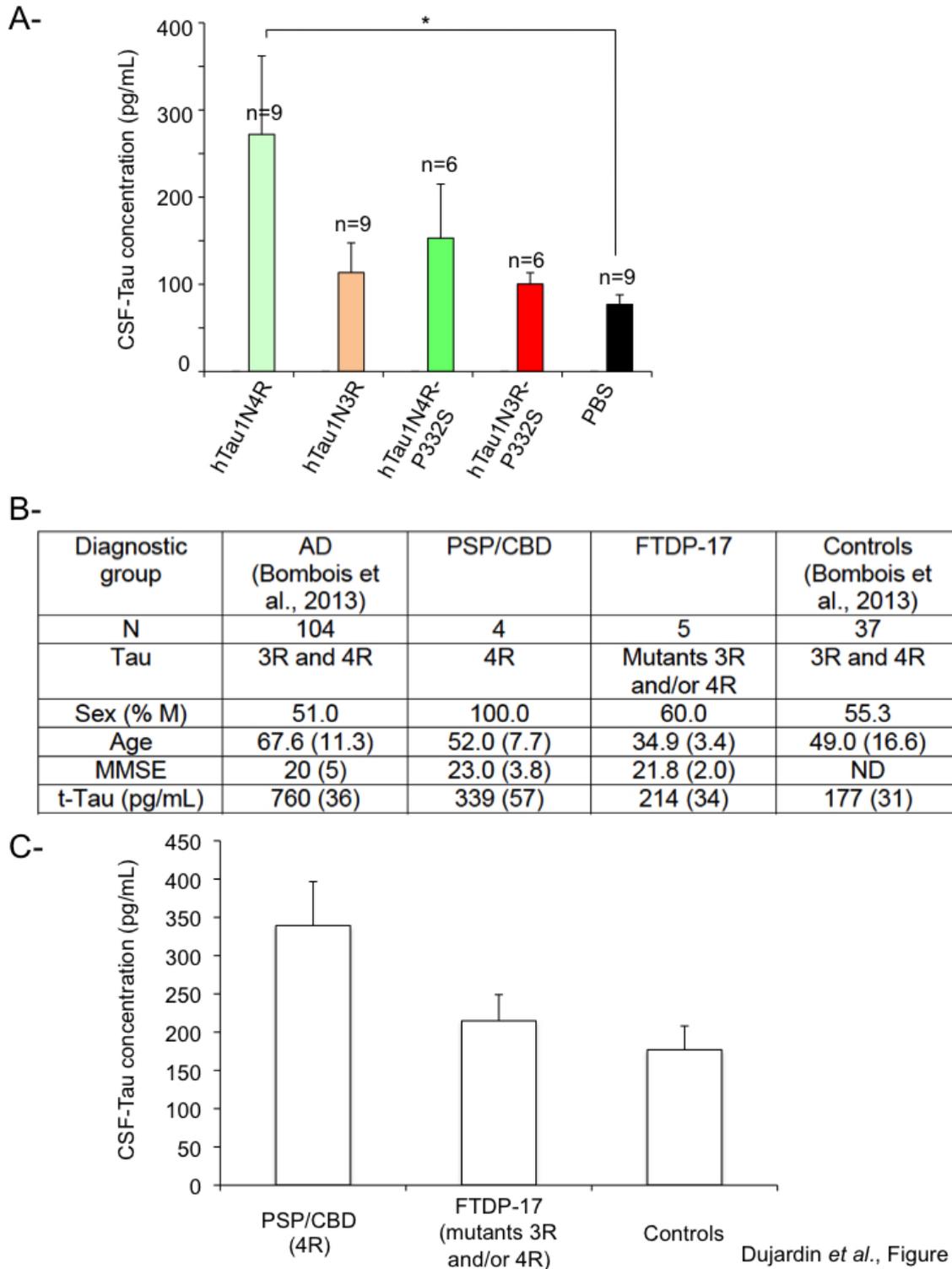


Figure 3: Tau species modulate Tau secretion in the CSF. **A-** LVs that encoded hTau1N4R, hTau1N4RP332S, hTau1N3R or hTau1N3RP332S were bilaterally injected into the CA1 layer of the rat brains, and the CSF were recovered 4 months post-delivery. The total Tau amount (pg/mL) was determined via ELISA. **B-** The data of the four diagnostic groups, N: number of subjects; Tau: composition in Tau isoforms aggregates, % M: percentage of males; ND: not determined; Tau, MMSE: Mini Mental State Examination and age are expressed as the mean (standard deviation). **C-** The total Tau amount (pg/mL) present in the CSF samples from the four groups was determined via ELISA and expressed in pg/mL.

process of oligomerisation and subsequent aggregation. More recently, Mandelkow's group also identified a novel diffusion barrier for the axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration²⁰. This barrier does not depend on actin but depends on microtubules and specific phosphorylation sites that detach Tau from the microtubules. The microtubule affinity dependence may also influence the neuronal localisation of the 3R or Tau mutants as their binding to microtubules is reduced. This breakdown diffusion barrier theory supports the hypothesis that the phospho-Tau 4R isoforms may be primarily localised to the axonal part of the neurons and more available for secretion at the post-synaptic levels, whereas phospho-Tau 3R or phospho mutant Tau are most likely relocalised to the soma and less available for secretion. Together these hypotheses are supported by our data showing that the isoforms and MAPT mutations alter the total Tau ability to be secreted in the extracellular fluids (Fig 3). Nevertheless, the function of this extracellular and secreted Tau remains undefined, despite its regulation by neuronal activity⁹. Specifically, whether this secreted Tau plays a role in the progressive appearance of Tau pathology is still unclear.

In conclusion, our study is the first study to identify a differential propensity of the Tau isoforms/mutations to mediate Tau pathology spreading, which most likely occurs by a failure in the secretion process. These characteristics may explain certain phenotypic specificities associated with human tauopathies.

Acknowledgment

Supported by LabEx DISTALZ, FUI MEDIALZ and DN2M (VICTAUR), Inserm, CNRS, University of Lille, Métropole Européenne Lille, FEDER and Région Nord-Pas-de-Calais.

Author contributions

M.C., V.D., S.D. and L.B. designed the research. S.D., S.B., C.L., R.C., S.C., V.Z., N.D. and M.C. performed the research. S.C-M., F.P. and V.D. recruited the human CSF. M.C., S.D. and L.B. analysed the data and wrote the paper. The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393:702-705.
2. Spillantini MG, Crowther RA, Kamphorst W, Heutink P, et al. Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau. *Am J Pathol* 1998;153:1359-1363.
3. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-259.
4. Verny M, Duyckaerts C, Agid Y, Hauw JJ. The significance of cortical pathology in

- progressive supranuclear palsy. Clinico-pathological data in 10 cases. *Brain* 1996;119:1123-1136 .
5. Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, et al. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* 2007;130:1566-1576.
 6. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, et al. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:911-918.
 7. Sergeant N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:179-197.
 8. Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, et al. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 2013;14:389-394.
 9. Yamada K, Holth JK, Liao F, Stewart FR, et al. Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J Exp Med* 2014;211:387-393.
 10. Caillierez R, Bégard S, Lécolle K, Deramecourt V, et al. Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Mol Ther* 2013;21:1358-1368.
 11. Dujardin S, Lécolle K, Caillierez R, Bégard S, et al. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Comm* 2014;Jan 30;2:14.
 12. Deramecourt V, Lebert F, Maurage CA, Fernandez-Gomez FJ, et al. Clinical, neuropathological, and biochemical characterization of the novel tau mutation P332S. *J Alzheimers Dis* 2012;31:741-749.
 13. Bombois S, Duhamel A, Salleron J, Deramecourt V, et al. A new decision tree combining Abeta 1-42 and p-Tau levels in Alzheimer's diagnosis. *Curr Alzheimer Res* 2013;10:357-364.
 14. Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, et al. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2012;287:3842-3849.
 15. Simón D, García-García E, Gómez-Ramos A, Falcón-Pérez JM, et al. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis* 2012;10:73-75.
 16. Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, et al. Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* 2014;9:e100760.
 17. Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, et al. Cerebrospinal fluid profile in

frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005;57:721-729.

18. Chang E, Kim S, Yin H, Nagaraja HN, et al. Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps. *J Neurochem* 2008;107:1113-1123.
19. Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8463-8467.
20. Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, et al. Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J* 2011;30:4825-4837.

I.3. Résultats complémentaires

I.3.1. Les protéines Tau 3R sont également transférées à longue distance

Dans l'étude précédente, nous indiquons que selon les isoformes de protéines Tau, la progression spatio-temporelle de la pathologie Tau dans le cerveau est différente. Nous avons voulu, à l'instar de ce que nous avons développé dans l'article N°2, examiner le transfert de la protéine Tau depuis le site d'injection. Ainsi, nous avons, en collaboration avec l'équipe du Pr Déglon (Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, CHUV, Lausanne), développé de nouveaux vecteurs viraux codant pour les différents isoformes de protéines Tau mais cette fois couplés avec l'étiquette V5. De manière similaire à ce qui est observé avec la protéine Tau mutée en P301L, il semble que tous les isoformes de protéines Tau soient transférées de cellule en cellule indépendamment de la présence de 3 ou 4 domaines de liaison aux microtubules (figure 28).

I.3.2. Les protéines Tau mutées, une conformation anormale précoce.

Récemment, en utilisant un modèle de souris P301S, une étude de l'équipe du Dr Diamond a suggéré que la capacité des protéines à devenir un agent de nucléation est un mécanisme précoce dans le développement de la pathologie Tau. De manière intéressante, dans leur modèle, les auteurs montrent que la capacité de « seeding » apparaît avant la conformation MC1 apparaissant elle-même avant l'hyperphosphorylation notamment de l'épitope AT8 (Holmes *et al*, 2014). Notre modèle de rat est un modèle d'apparition progressive de la pathologie, nous nous sommes donc demandés si nous pouvions reproduire cette cascade pathologique moléculaire. Nous avons donc examiné l'apparition des épitopes AT8 et MC1 dans notre modèle de rat. Il est intéressant de constater que l'ordre d'apparition semble différent si la protéine Tau surexprimée est sauvage ou mutée. En effet, nous reproduisons les résultats de Holmes et collaborateurs quand une protéine mutée est surexprimée. En effet, quand une protéine Tau 3R ou 4R, mutée en P332S ou P301L, est surexprimée, nos résultats semblent suggérer que la conformation anormale MC1 apparaît avant l'état d'hyperphosphorylation AT8 (figure 29B). Par contre, que ce soit avec l'isoforme 1N4R ou l'isoforme 1N3R sauvages, force est de constater que dans les différentes cinétiques post-injection et notamment aux temps précoces, l'épitope AT8 apparaît dans certaines régions indépendamment de la présence d'immunomarquage MC1 (figure 5A de l'article 2,

Résultats – Chapitre 2
 figure 29A). Nous suggérons donc clairement que les processus pathologiques qui se mettent en place avec les protéines Tau mutées ou sauvages sont différents. Ces résultats sont, bien entendu, préliminaires et mériteraient des vérifications plus approfondies par exemple en biochimie mais nous permettent de mettre en évidence des différences de comportement importantes entre protéines sauvages et mutées. Nous pouvons d'ailleurs rappeler que plusieurs études indépendantes ont démontré que les protéines mutées ont une nucléation et une fibrillogenèse plus rapides et plus fortes mais également des fibres aux propriétés biochimiques divergentes (Chang *et al*, 2008; Frost *et al*, 2009b).

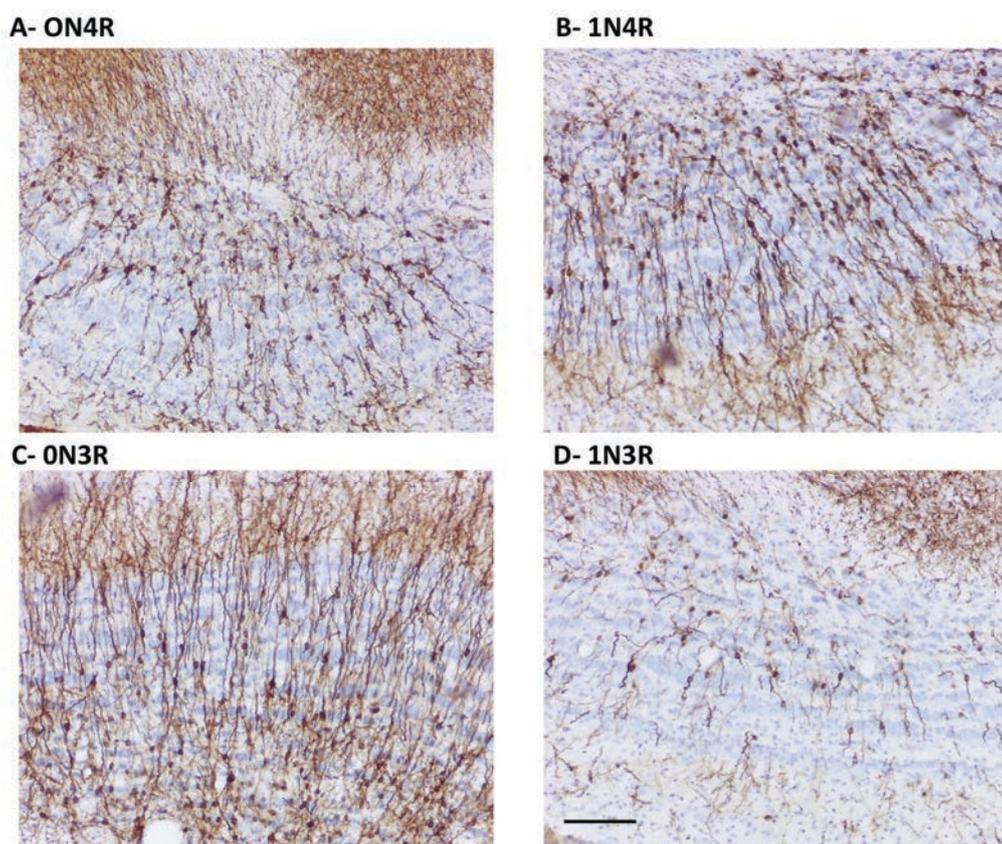
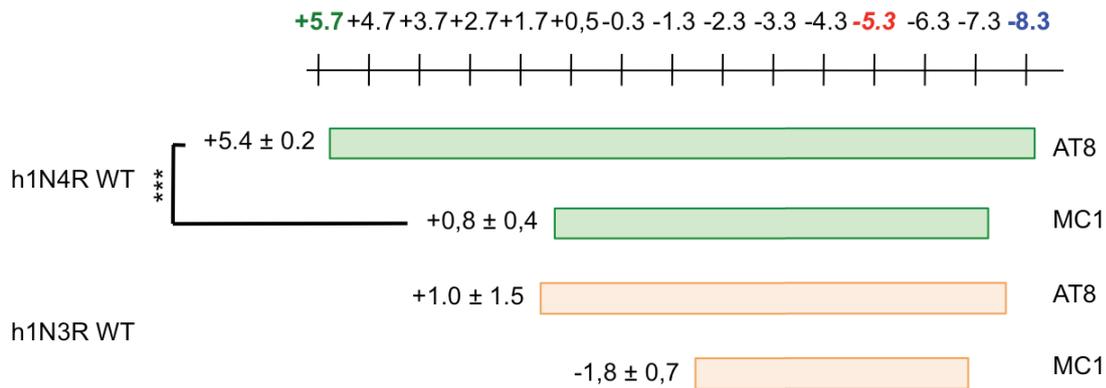


Figure 28- Les différentes isoformes de protéines Tau sont toutes transférées dans la GrO. Des vecteurs viraux codant pour la protéines Tau humaine V5-hTau0N4R (A), V5-hTau1N4R (B), V5-hTau0N3R (C) et V5-hTau1N3R (D) ont été injectés dans l'hippocampe de rats wistar. 5 mois post-injection, ceux-ci ont été sacrifiés et les cerveaux analysés par immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre l'épitope V5. Des images représentatives de la GrO des rats de chaque groupe sont représentées ici. Nous pouvons observer que dans tous les cas, des corps cellulaires immunopositifs V5 peuvent être observés confirmant que pour toutes les isoformes, le transfert de la protéine Tau reste fonctionnel. Barre d'échelle : 100 μ m

Figure 28- The different Tau isoforms are all transferred in the GrO. Viral vectors encoding human Tau protein V5-hTau0N4R (A), V5-hTau1N4R (B), V5-hTau0N3R (C) and V5-hTau1N3R (D) were injected in the hippocampus of wistar rats. 5 months post-injection, rats were sacrificed and brains analyzed by immunohistochemistry with an antibody raised against V5 epitope. Representative images of rats GrO from each group are presented here. We can observe in each case V5-immunopositive cell bodies confirming that for all isoforms, the transfer of Tau remains functional. Scale bar: 100 μ m.

A-WT



B- Mutated

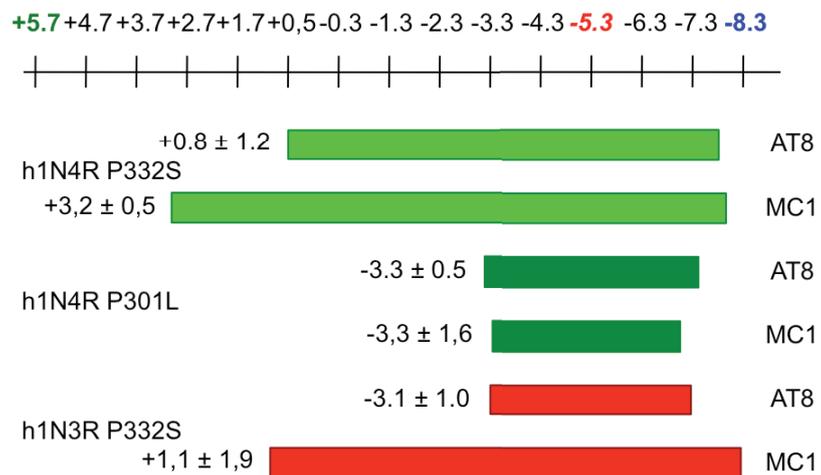


Figure 29- Les protéines Tau mutées acquièrent une conformation anormale précoce. Evolution de l'apparition des épitopes AT8 (hyperphosphorylation) et MC1 (conformation anormale) chez les rats injectés avec des vecteurs viraux codant pour la protéine Tau humaine hTau1N4R (n = 3, **panel A, vert**), hTau1N3R (n = 5, **panel A, orange**), hTau1N4RP332S (n = 5, **panel B, vert clair**), hTau1N4RP301L (n = 5, **panel B, vert foncé**) ou hTau1N3RP332S (n = 5, **panel B, rouge**). Les vecteurs viraux ont été injectés de manière bilatérale dans la couche CA1 de l'hippocampe de rats wistar. Huit mois après injection, les rats sont sacrifiés et une analyse immunohistochimique est réalisée sur le cerveau entier avec les anticorps primaires AT8 et MC1. Parmi les rats immunoréactifs, les coordonnées les plus rostrales et les plus caudales marquées pour chaque anticorps ont été déterminées sur chaque cerveau.

Figure 29- Mutated Tau proteins are precociously misfolded. Evolution of the appearance of epitopes AT8 (hyperphosphorylation), MC1 (abnormal conformation) in rats injected with LVs encoding human Tau hTau1N4R (n = 3, **panel A, green**), hTau1N3R (n = 5, **panel A, orange**), hTau1N4RP332S (n = 5, **panel B, light green**), hTau1N4RP301L (n = 5, **panel B, dark green**) or hTau1N3RP332S (n = 5, **panel B, red**). LVs are injected bilaterally in the CA1 layer of the hippocampus of wistar rats. 8 months post-injection, rats were sacrificed and an immunohistochemical analysis has been realized on the entire brain using antibodies AT8 and MC1. Among the immunoreactive rats, the rostralmost and caudalmost immunolabelled coordinates for each antibody were determined on each brain.

I.4. Discussion

Dans cette étude, nous montrons dans notre modèle que la pathologie Tau évolue différemment selon l'espèce surexprimée. Ainsi, en couplant les résultats des articles 2 et 3, nous montrons que la pathologie Tau induite par la surexpression de protéines Tau mutées reste focale, aux abords du site d'initiation, et n'évolue pas dans des régions distantes. Il est intéressant de noter que ces résultats sont confirmés en utilisant deux mutations différentes : la très usitée P301L et la mutation P332S. Des résultats similaires ont par ailleurs été obtenus en comparant des isoformes de protéine Tau 3R et 4R. En effet, les protéines Tau 3R ont un profil d'évolution restreint au site d'injection, similairement aux protéines mutées. Ces résultats, et particulièrement le fait que deux mutations différentes aient le même effet, suggèrent que les différences de progression de la pathologie sont dues aux propriétés intrinsèques des protéines plus qu'à des mécanismes séquence-spécifiques. Nous pouvons ainsi penser que les protéines Tau 3R comme mutées ont une affinité plus faible avec les microtubules ainsi qu'une agréabilité plus importante que les protéines Tau 4R sauvages. Cette caractéristique pourrait prôner la formation de gros agrégats ne se déplaçant pas et évoluant plus difficilement de cellule en cellule vers des zones lointaines. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier. Il est aussi probable que selon les isoformes de protéines Tau, il y ait des différences dans les cinétiques de « seeding » de la pathologie et qu'il y ait une certaine spécificité de recrutement de certaines isoformes comme suggéré par Nonaka et collaborateurs (Nonaka *et al*, 2010). Pour tenter de comprendre ces différences de propagation entre isoformes, une étude en collaboration avec l'équipe du Dr Melki (Neuro-PSI, CNRS, Paris Saclay) a débuté au sein de notre groupe pour comparer, *in vitro* et *in vivo*, les capacités de seeding des différentes isoformes. Pour finir, nous pouvons aussi noter que, de manière semblable à ce qui est observé pour les protéines 4R ou mutées, les protéines Tau 3R sont transférées de cellule en cellule vers des zones lointaines suggérant encore des différences entre les espèces propagatives et pathologiques de la protéine Tau. Des différences significatives de présence de protéines Tau dans le LCR sont également retrouvées. Cependant, il est difficile de savoir quel est le rôle pathologique du transfert de Tau et de la présence de Tau dans le LCR. De plus, les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à ce transfert sont particulièrement méconnus et nous nous demanderons donc, dans la partie suivante, comment les protéines Tau pourraient être transférées d'une cellule à une autre ?

II. Les vésicules extracellulaires, un moyen de transport pour la protéine Tau ?

II.1. Introduction

Nous avons démontré, dans les parties précédentes, que la protéine Tau, comme la pathologie Tau, est transférée de cellule en cellule. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études (Pour revue : (Hanger *et al*, 2014)) mais cependant, les mécanismes sous-jacents restent méconnus et peu investigués. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées depuis l'implication de nanotubes, de vésicules extracellulaires ou encore un mécanisme de sécrétion/recapture de la protéine libre (figure 16). Quelques études, majoritairement *in vitro*, ont montré que la protéine Tau est sécrétée depuis différentes cellules en culture de manière libre ou dans des vésicules extracellulaires nommées exosomes (Voir Introduction chapitre 4 II.2.3). Cependant, l'implication de ces mécanismes reste inconnue dans un contexte pathologique. L'invagination de l'endosome primaire forme des vésicules intraluminales. Quand ces structures intracellulaires appelées corps multivésiculaires fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule, les exosomes sont relargués dans le milieu extracellulaire (Kowal *et al*, 2014). L'implication des exosomes a été suggérée dans beaucoup de protéinopathies (Rajendran *et al*, 2014) mais sa pertinence dans le cas de la sécrétion de la protéine Tau peut être mise en question. La présence de la protéine Tau dans les exosomes est, elle, controversée (Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015; Santa-Maria *et al*, 2012). De plus, la protéine Tau n'est pas décrite comme impliquée dans des phénomènes d'endocytose, ce qui nous pousse à nous demander comment la protéine Tau se retrouverait de manière spécifique dans ces vésicules. Par contre, connaissant la liaison de la protéine Tau avec la membrane plasmique et particulièrement au sein des radeaux lipidiques (Kawarabayashi *et al*, 2004; Williamson *et al*, 2008), il pourrait être cohérent de poser l'hypothèse que la protéine Tau soit retrouvée au sein de vésicules extracellulaires nommées ectosomes. Ces vésicules, aussi appelées microparticules, ont un diamètre de 100 à 1000 nm (taille variable en fonction des types cellulaires) et sont issues d'un bourgeonnement direct de la membrane plasmique. Il semblerait que le mécanisme de biogenèse des microparticules soit dépendant de la formation de radeaux lipidiques. Dans nos différents modèles d'étude, nous avons donc testé la sécrétion de la protéine Tau et particulièrement sa présence dans des vésicules extracellulaires de type exosomes et ectosomes. Les résultats sont présentés dans l'article suivant.

II.2. Article 4 : Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein

REFERENCE: Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas M-C, Bousset L, Melki R, Aurégan G, Hantraye P, Brouillet E, Buée L & Colin M (2014a) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS ONE* **9**: e100760

AUTHORS: Simon Dujardin^{1,2}, Séverine Bégard^{1,2}, Raphaëlle Caillierez^{1,2}, Cédric Lachaud^{1,2}, Lucie Delattre^{1,2}, Sébastien Carrier^{1,2}, Anne Loyens^{1,2}, Marie-Christine Galas^{1,2,3}, Luc Bousset⁴, Ronald Melki⁴, Gwennaëlle Aurégan^{5,6}, Philippe Hantraye^{5,6}, Emmanuel Brouillet^{5,6}, Luc Buée^{1,2,3*}, Morvane Colin^{1,2,3*}.

¹Inserm, UMR837, Lille, France, ²Université de Lille, Faculté de Médecine, IMPRT, JPARC, Lille, France, ³CMRR, CHR, Lille, France, ⁴Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, UPR 3082 CNRS, Gif-sur-Yvette, France, ⁵Atomic Energy Commission (CEA), Institute of Biomedical Imaging (I2BM), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France, ⁶CNRS, URA2210, Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France

ABSTRACT:

Tau is a microtubule-associated protein that aggregates in neurodegenerative disorders known as tauopathies. Recently, studies have suggested that Tau may be secreted and play a role in neural network signalling. However, once deregulated, secreted Tau may also participate in the spreading of Tau pathology in hierarchical pathways of neurodegeneration. The mechanisms underlying neuron-to-neuron Tau transfer are still unknown; given the known role of extra-cellular vesicles in cell-to-cell communication, we wondered whether these vesicles could carry secreted Tau. We found, among vesicles, that Tau is predominately secreted in ectosomes, which are plasma membrane-originating vesicles, and when it accumulates, the exosomal pathway is activated.

INTRODUCTION:

Abundant and abnormal accumulation of the hyperphosphorylated microtubule-associated protein Tau is a pathological feature of the neurodegenerative diseases known as tauopathies [1]. The pathological events leading to neurofibrillary degeneration include reproducible loco-regional patterns of Tau expression that differ among sporadic tauopathies, such as Alzheimer's Disease (AD) [2,3], Progressive Supranuclear Palsy (PSP) [4] or Argyrophilic Grain Disease (AGD) [5]. This neurodegeneration process has been attributed to

III. Résultats complémentaires : sécrétion de la protéine Tau.

III.1. **Les vésicules extracellulaires, un moyen de transfert de la protéine Tau**

Dans l'étude précédente, nous mettons en évidence la présence de la protéine Tau dans deux types de vésicules extracellulaires : les exosomes et les ectosomes. Cependant, nous ne montrons pas que la protéine Tau est transférée de cellule en cellule via ce système. Pour apporter la preuve de concept de ce mécanisme, nous avons établi une lignée HeLa exprimant stablement une protéine GFP membranaire (mGFP) (figure 30A-B). A partir de cette lignée nous avons réalisé des fractionnements d'ectosomes et d'exosomes que nous avons incubés avec des cellules HeLa naïves. La présence de GFP membranaire, observée par microscopie confocale, dans les cellules secondaires démontre que les vésicules sont capables d'aller rejoindre des cellules secondaires (figure 30C-D). Nous avons alors exprimé une protéine Tau V5 (hTau1N4RV5) dans cette lignée mGFP à l'aide de vecteurs viraux et purifié des vésicules extracellulaires à partir des milieux de culture. Ces vésicules ont ensuite été incubées avec des cellules naïves. L'analyse par microscopie confocale révèle un transfert très efficace de la protéine Tau via les ectosomes au contraire du transfert via les exosomes qui est observé dans une minorité de cellules (figure 30E-F), reflétant probablement le peu d'exosomes internalisés dans les cellules receveuses. Ces données démontrent clairement que les ectosomes sont un moyen de transport intercellulaire efficace pour le transport des protéines Tau.

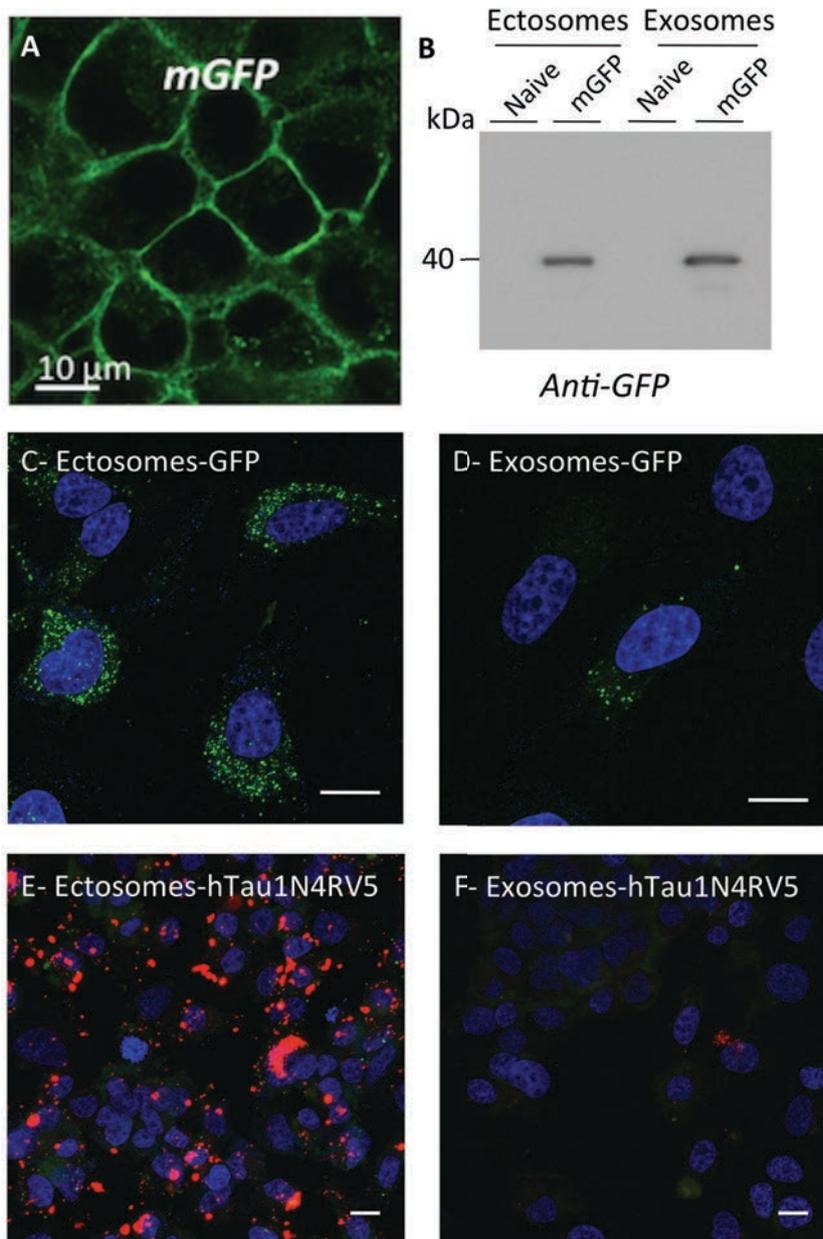


Figure 30- Les protéines Tau sont transférées de cellule en cellule via des ectosomes. **A-** Lignée stable de cellules HeLa surexprimant une protéine GFP membranaire (mGFP) et imagée au microscope confocal. **B-** Des vésicules extracellulaires de type ectosomes et exosomes ont été purifiées à partir de cellules HeLa naïves ou mGFP et caractérisées biochimiquement en western blot avec un anticorps anti-GFP. **C/D-** Des ectosomes (**C**) ou exosomes (**D**) ont été purifiées à partir de milieu de culture de cellules mGFP et incubées une nuit à 37°C avec des cellules naïves. Les cellules ont ensuite été fixées, les noyaux sont marqués à l'aide de DAPI puis les cellules sont imagées au microscope confocal : bleu = DAPI, vert = GFP. **E/F-** Des ectosomes (**E**) ou des exosomes (**F**) ont été purifiées à partir de milieux de culture de incubées avec des cellules naïves 2h à 37°C. Les

cellules ont ensuite été fixées, une immunocytochimie anti-V5 réalisée, les noyaux sont marqués à l'aide de DAPI puis les cellules sont imagées au microscope confocal : bleu = DAPI, rouge = V5. Barre d'échelle = 10 μm

Figure 30- Tau proteins are transferred from cell-to-cell via ectosomes. **A-** HeLa cells stably overexpressing a membraneous GFP (mGFP) are imaged with a confocal microscope. **B-** Ectosomal and exosomal extracellular vesicles were purified from naive HeLa or mGFP HeLa. These vesicles were then characterized biochemically by western blotting with an antibody raised against the GFP. **C/D-** Ectosomes (**C**) or exosomes (**D**) were purified from mGFP cells culture medium and incubated overnight at 37°C with naive cells. Cells were then fixed, nucleus labelled with DAPI and imaged using a confocal microscope: blue = DAPI, green = GFP. **E/F-** Ectosomes (**E**) or exosomes (**F**) were purified from hTau1N4R overexpressing mGFP cells culture medium and incubated 2h at 37°C with naive cells. Cells were then fixed, immunolabelled with an antibody raised against the V5 epitope, nucleus were labelled with DAPI and imaged using a confocal microscope: blue = DAPI, red= V5. Scale bar = 10 μm

III.2. Présence de vésicules extracellulaires dans les fluides biologiques simiens

Dans le cadre de notre projet collaboratif sur la modélisation de la pathologie chez le macaque détaillé dans le chapitre 0, nous avons également investigué la présence de vésicules extracellulaires contenant la protéine Tau dans les fluides biologiques (plasma et LCR). Nous avons réalisé cette expérience avec une cinétique à 3, 5, 7 et 12 mois post-infection par les vecteurs viraux. Il est intéressant de constater que des protéines Tau sont présentes de manière importante dans les fluides biologiques des macaques. Nous pouvons aussi observer une augmentation du pourcentage de vésicules Tau-positives à 7 mois post-injection. Cette augmentation n'est par contre pas confirmée à 12 mois post-injection (figure 31).

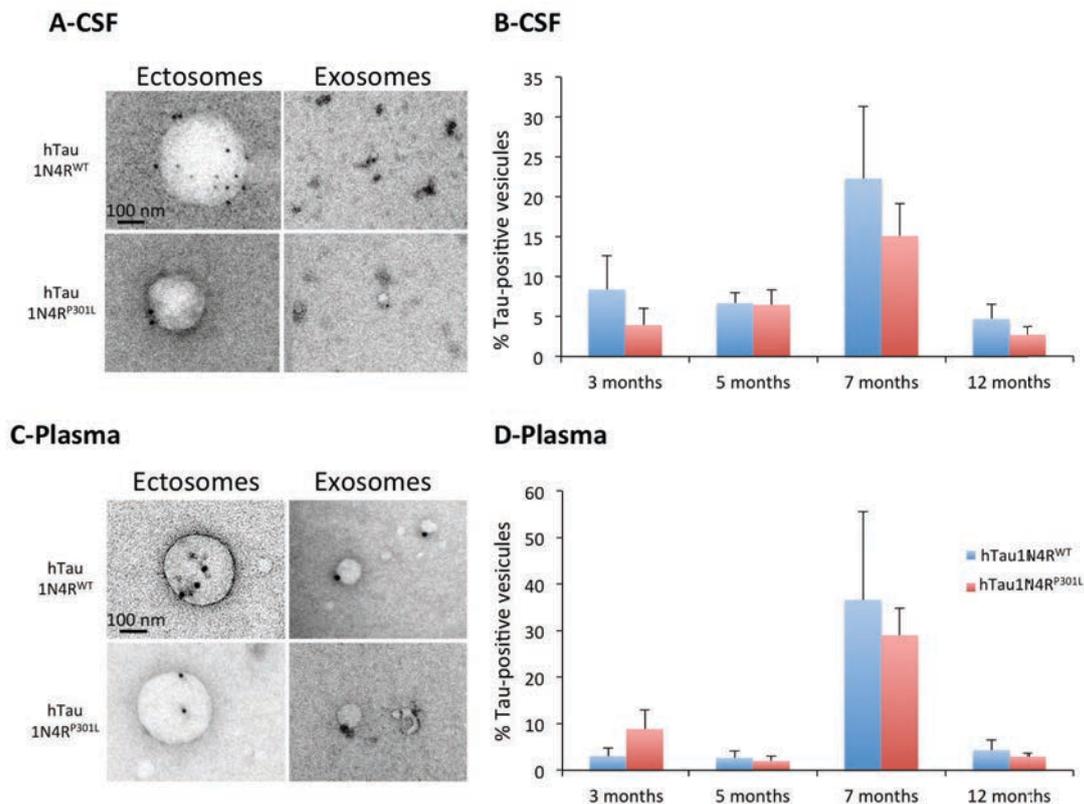


Figure 31- La protéine Tau est présente dans des vésicules extracellulaires purifiées à partir de plasma et de LCR d'un modèle de tauopathies chez le PNH. Des vésicules extracellulaires (exosomes ou ectosomes) ont été purifiées par centrifugation différentielle à partir de LCR (ou CSF pour cerebrospinal fluid - A/B) et de plasma (C/D) de macaques injectés avec des vecteurs AAVs codant pour la protéine Tau 1N4R sauvage (en bleu) ou mutée 1N4RP301L (en rouge) 3, 5, 7 et 12 mois post-injection. Un marquage immunogold en microscopie électronique avec un anticorps dirigé contre la partie aminotermine de la protéine Tau a été réalisé et le pourcentage de vésicules marquées sur le nombre total de vésicules a été quantifié. Les résultats sont représentés, ici, sous forme d'histogrammes.

Figure 31- Tau proteins are retrieved inside extracellular vesicles purified from plasma and CSF of a NHP model of tauopathy. Exosomes or ectosomes were purified by differential centrifugation from CSF (A/B) or plasma (C/D) of NHP injected with AAV encoding human →

← Tau 1N4R (blue) or 1N4RP301L (red), 3, 5, 7 and 12 months post-injection. Immunogold labelling is observed with an electronic microscope using an antibody raised against the amino-terminal part of Tau. The percentage of vesicles labelled on the total number of vesicles was quantified. Results are presented here as histograms.

III.3. Les protéines Tau sauvages et mutées, sécrétées différemment au sein des ectosomes

Nous avons ensuite tenté de comprendre si les protéines Tau mutées ou sauvages sont sécrétées de la même manière dans les vésicules extracellulaires. Nous avons donc récupéré par une technique de push-pull du fluide interstitiel de rats injectés avec des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine Tau 1N4R sauvage ou la protéine Tau 1N4R mutée en P301L 5 mois post-injection. Après purification vésiculaire, nous avons quantifié le nombre de vésicules Tau-positives par une analyse en microscopie électronique avec un marquage de type immunogold. Ces résultats montrent que la protéine Tau est bien présente dans les ectosomes et exosomes (figure 32A/B). Nous montrons également une quantité significativement plus importante d'ectosomes Tau-positifs chez les rats surexprimant la protéine Tau sauvage en comparaison avec la protéine mutée et les rats injectés avec du PBS. Il est assez intéressant de noter que des protéines Tau sont néanmoins présentes dans les rats injectés avec du PBS, confirmant la sécrétion physiologique de la protéine Tau via les ectosomes (figure 32C). Par contre, le nombre faible d'exosomes Tau-positifs ne permet pas de démontrer une différence significative de sécrétion.

III.4. La protéine Tau, une protéine fusogénique ?

Comme indiqué dans l'article 4 et documenté par de nombreuses études dans plusieurs modèles différents, la protéine Tau est retrouvée de manière libre dans le milieu extracellulaire sous forme tronquée ou non (article 4 page 194 ; Santa-Maria *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015; Plouffe *et al*, 2012). Si la présence de protéines Tau libres dans le milieu extracellulaire est maintenant bien documentée, les mécanismes de sortie de la protéine restent inconnus. Etant donné que la protéine Tau est une protéine cytosolique, sa traduction n'a donc pas lieu au sein du réticulum endoplasmique et sa sécrétion par la voie d'exocytose classique est donc peu probable. Nous nous sommes donc demandés si la protéine Tau pouvait avoir des propriétés fusogéniques et nous avons débuté une collaboration avec les équipes du Pr Römer (Center for Biological Signalling Studies, BIOSS,

Freiburg,

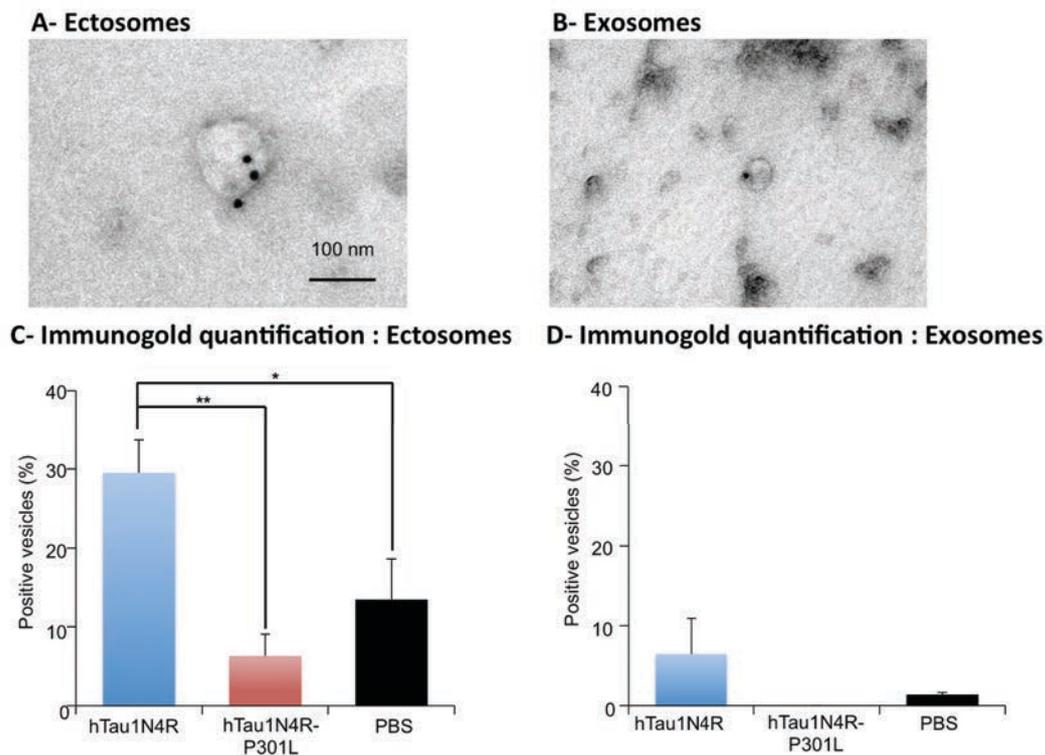
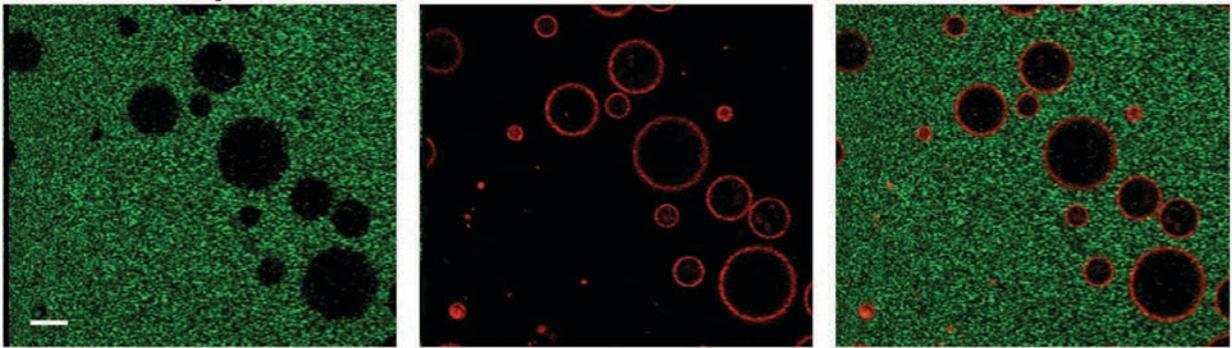


Figure 32- Sécrétion différentielle selon l'espèce de Tau surexprimée chez le rat. Des exosomes et ectosomes ont été purifiés à partir de liquide interstitiel provenant de rat injectés avec des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine Tau humaine 1N4R sauvage, 1N4R mutée en P301L ou du PBS. 5 mois post-injection, n=5 animaux par groupe. **A/B-** Respectivement un ectosome et un exosome Tau positifs observés en microscopie électronique avec un marquage immunogold dirigé contre la partie amino-terminale de la protéine Tau. **C/D-** Quantification du pourcentage d'ectosomes ou d'exosomes Tau-positifs chez les rats surexprimant la protéine Tau 1N4R sauvage (bleu) ou mutée 1N4RP301L (rouge) ou injectés avec du PBS (noir). Les données statistiques ont été obtenues en utilisant un test non paramétrique de Mann-Whitney, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$.

Figure 32- Differential secretion depending on Tau species overexpressed in the rat brain. Exosomes and ectosomes were purified from Interstitial fluid (ISF) coming from rats injected with LVs encoding the human Tau 1N4R, 1N4RP301L or PBS. 5 months post-injection, n = 5 animals per group. **A/B-** respectively, one ectosome and one exosome immunopositive for Tau observed in electronic microscopy with an antibody raised against the aminoterminal part of Tau. **C/D-** Quantification of the percentage of ectosomes or exosomes Tau-positives in the rats overexpressing Tau 1N4R (blue) or 1N4RP301L (red) or injected with PBS (black). The statistical analysis were realized with a non parametric Mann-Whitney test, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$.

et du Dr Melki (Neuro-PSI, CNRS, Paris Saclay). L'objectif de ce travail était de déterminer le comportement de la protéine Tau en présence de membrane artificielle sous forme de liposomes géants (Giant Unilamellar Vesicles, GUVs). Des protéines Tau humaines recombinantes solubles 1N4R et fluorescentes ont été mises en présence de GUVs reproduisant la composition de la membrane plasmique externe. Les GUVs ont été visualisées en microscopie confocale pour observer le comportement de la protéine Tau mais également

A- No Tau proteins are retrieved inside the vesicles

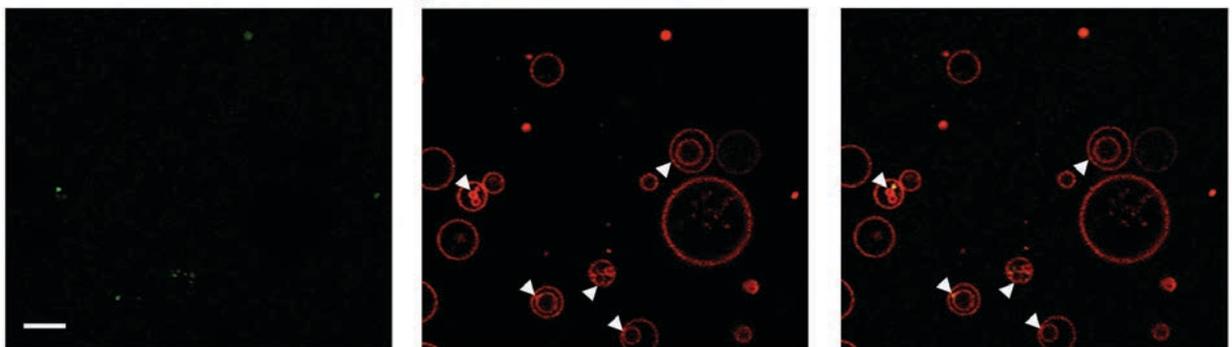


Tau

Membrane

Merged

B- Presence of intra-liposomal vesicles

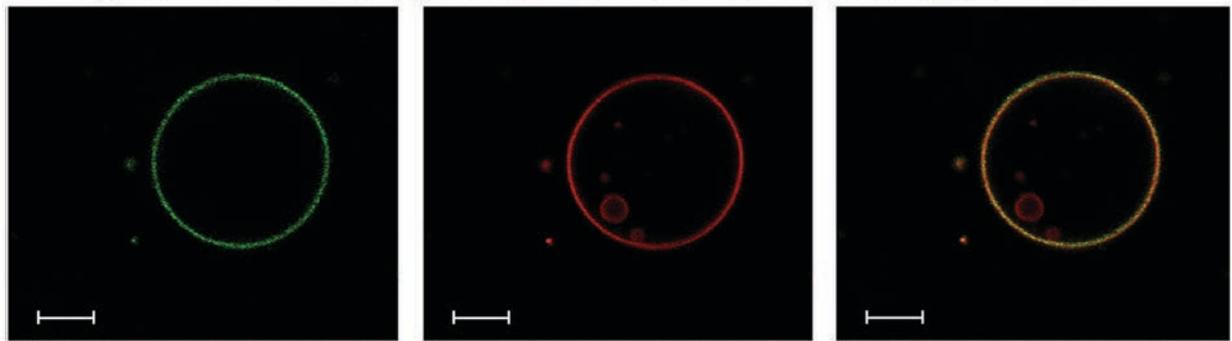


Tau

Membrane

Merged

C- Typical profile of a plasma-membrane interacting protein.

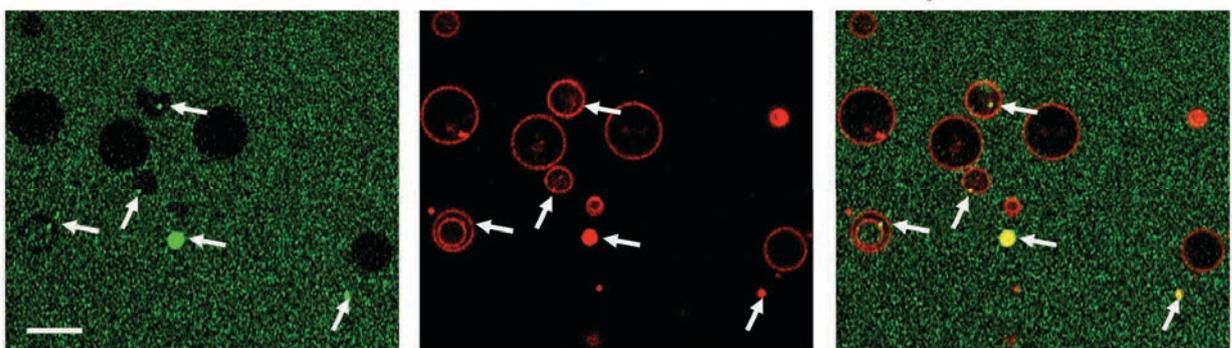


Membrane-
interacting protein

Membrane

Merged

D- Presence of inclusions at the border of small liposomes.



← **Figure 33- Incubation de protéines Tau recombinantes avec des liposomes synthétiques modélisant la membrane externe de la cellule.** Des liposomes ont été créés à partir d'une solution de DOPC (dioléoylphosphatidylcholine), de cholestérol et d'un intercalant membranaire fluorescent (rouge). Des protéines Tau recombinantes humaines 1N4R ont été incubées avec ces liposomes et les liposomes ont été observés en microscopie confocale. **A-** Afin de détecter les protéines Tau solubles dans le milieu aqueux, la puissance du laser a été augmentée. Il est ainsi observé qu'aucune protéine Tau ne semble passer la membrane des liposomes. **B-** Des vésicules intra-liposomales peuvent être observées après incubation avec la protéine Tau (têtes de flèches). **C-** Quand une protéine (autre que la protéine Tau) interagit avec la membrane, un enrichissement est présent et forme un anneau vert. Ce n'est pas le cas avec la protéine Tau comme cela est visible sur les panels A/B/D. **D-** Des inclusions peuvent être observées sur les membranes de petits liposomes (flèches). Barres d'échelle : 10 µm.

Figure 33- Incubation of recombinant Tau proteins with synthetic liposomes modelling the external cellular plasma membrane. Giant unilamellar liposomes were created from a solution of DOPC (dioléoylphosphatidylcholine), cholesterol and a membraneous fluorescent intercalant (red). Recombinant Tau proteins 1N4R were incubated with liposomes and they were observed with a confocal microscope. **A-** In order to detect soluble Tau proteins in an aqueous medium, the strength of the laser was increased. We can observe that no Tau proteins seemed to cross the membrane of liposomes. **B-** Intraliposomal vesicles can be observed after incubation with Tau proteins (arrowhead). **C-** When a protein (other than Tau) interacts with the membrane, an enrichment can be observed resulting in the formation of a green "ring". This is not the case with Tau as it can be observed in panel A/B/D. **D-** Tau inclusions can be observed on the membranes of small liposomes (arrow). Scale bars: 10 µm.

des membranes (les procédures expérimentales sont décrites dans (Römer *et al*, 2010)). Cette expérience n'a été réalisée qu'une fois et n'est donc pas conclusive mais a permis de mettre en évidence plusieurs données intéressantes : 1) Il ne semble pas que la protéine Tau soit capable, par elle-même, de traverser les membranes car aucune protéine Tau n'est visible à l'intérieur des liposomes (figure 33A), 2) Il est probable que la protéine Tau induise par elle-même des phénomènes d'invagination car des vésicules intra-liposomales peuvent être visualisées (figure 33B). Cependant, ces phénomènes peuvent aussi se produire quand l'osmolarité de la préparation lipidique n'est pas respectée et l'expérience doit donc être reproduite pour confirmer cette donnée, 3) La protéine Tau ne semble pas, par elle-même, interagir avec ce type de membranes car il n'est pas observé d'enrichissement de la protéine au niveau des membranes comme cela peut être observé avec une protéine se liant aux membranes (shiga-toxine ; figure 33C), 4) Enfin, et de manière vraiment intéressante, il est observé, chez certains petits liposomes, des inclusions de protéines Tau très fluorescentes et très denses, cohérentes avec une agrégation de la protéine Tau. Il est à noter que ces inclusions n'apparaissent jamais indépendamment d'une membrane et ne sont présentes que sur des petits liposomes ce qui semble suggérer qu'une courbure importante de la membrane est indispensable pour la formation de ce type de structures (figure 33D). Il est important de préciser une fois de plus que cette expérience reste uniquement suggestive et mériterait de plus amples investigations pour tester notamment la reproductibilité mais aussi séparer les

liposomes selon leurs tailles, changer les compositions de membrane (pour tester l'effet sur une membrane interne par exemple, mais également l'impact de l'insertion de structures semblables aux radeaux lipidiques dans ces liposomes) et enfin tester plusieurs espèces protéiques et notamment les protéines agrégées.

IV. Discussion

En conclusion, dans cette dernière partie nous nous sommes intéressés à la sécrétion de la protéine Tau pour comprendre comment, une protéine cytosolique comme Tau peut être transférée de neurone en neurone. Précédemment ou parallèlement à nos travaux, plusieurs études ont déjà soulevé la question de la sécrétion de Tau montrant principalement la présence de Tau de manière libre dans le milieu extracellulaire mais aussi, et dans certaines conditions, dans des exosomes (pour revue : (Hanger *et al*, 2014)). Nous avons donc voulu savoir comment, dans nos modèles, la protéine est sécrétée. Nous avons testé l'hypothèse des exosomes, ainsi que celle d'un autre type de vésicules extracellulaires : les ectosomes. Nous avons, pour la première fois montré la présence ainsi que le transfert de Tau par les ectosomes dans plusieurs modèles allant des lignées cellulaires jusqu'au modèle de tauopathies chez le primate. Par ailleurs, nous avons également montré que cette sécrétion existe physiologiquement sans surexpression notamment dans le cerveau des rats et en culture primaire. Par contre, dans le cas physiologique, il ne semble pas que la protéine Tau soit présente dans les exosomes. Nous n'avons ainsi été capables de montrer la présence de Tau dans les exosomes qu'en cas de surexpression de la protéine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, nous pouvons penser que la présence de Tau dans les exosomes ne soit qu'un artefact des modèles de surexpression, mais il n'est pas encore exclu, comme le pensent certains auteurs, que ceux-ci soient un indicateur de la pathologie Tau chez l'homme (Saman *et al*, 2012; Hall & Saman, 2012; Fiandaca *et al*, 2015). La présence de la protéine Tau dans les exosomes pourrait d'ailleurs être le reflet de l'augmentation de l'autophagie décelée notamment dans la MA (Tang *et al*, 2015; Nixon, 2013). Par ailleurs, nous avons mis en évidence qu'une mutation de la protéine Tau entraîne une baisse significative de la présence de la protéine Tau dans les ectosomes. Nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse que les ectosomes participent de manière active au transfert de la pathologie Tau même s'il est évident que des études complémentaires sont nécessaires pour être affirmatif. Enfin, dans l'article 4, nous montrons, de manière cohérente avec d'autres études, que la majorité des

protéines Tau sont physiologiquement sécrétées librement dans le milieu extracellulaire. Cependant, aucun mécanisme permettant de comprendre comment la protéine Tau soluble sort librement de la cellule n'a été mis en évidence. Nous avons donc initié une étude pilote dont les premiers résultats semblent suggérer que la protéine Tau n'est pas capable de passer les membranes cellulaires librement. Cependant, cette hypothèse a, pour le moment, été testée uniquement sur des membranes synthétiques mimant la composition de la membrane extracellulaire. Il pourrait être intéressant d'essayer la composition d'une membrane intracellulaire notamment. Si la protéine Tau ne sort pas par fusion avec la membrane plasmique, une autre hypothèse devra être posée. Une étude récente suggère que les protéines Tau puissent être présentes dans le système d'exocytose conventionnel par l'appareil de Golgi (Tang *et al*, 2015). Cependant, personne n'a rapporté d'enrichissements de la protéine Tau dans les vésicules de sécrétion et si ce mécanisme existe, il est donc peu probable qu'il soit majoritaire.

Globalement, dans les résultats présentés ci-dessus, nous avons réussi à compléter la littérature, notamment en réussissant pour la première fois à modéliser le transfert de la protéine Tau sauvage de neurone en neurone. Nous avons également prouvé dans plusieurs modèles la présence physiologique de la protéine Tau dans des vésicules extracellulaires et nous avons apporté la preuve de concept que ces vésicules extracellulaires peuvent supporter le transfert de la protéine. Ensuite, il est intéressant de souligner que nous avons, également pour la première fois, réussi à modéliser l'évolution progressive et séquentielle de la pathologie Tau dans le cerveau de rat. En utilisant ce modèle, nous avons démontré qu'il existe des différences d'espèces de protéines Tau en terme de comportement propagatif : propagation de la pathologie Tau mais également sécrétion de la protéine. Ces différences pourraient expliquer, au moins en partie, les phénotypes et tableaux cliniques dissemblables au sein des tauopathies. Cependant, comme dans de nombreuses études, l'analyse de nos résultats est limitée à la validité de nos modèles ainsi qu'à l'état préliminaire de certaines données. Dans la partie suivante, nous discuterons de nos résultats en regard de la littérature en tentant d'avoir une vision globale des données en notre possession.

V. [Chapter 2: Mechanisms of Tau protein propagation, from molecular species to extracellular vesicles – Supplementary results.](#)

Following the Tau protein isoforms, the spatiotemporal evolution of Tau pathology is different. We wondered if, similar to 4R Tau, 3R Tau was also transferred from cell-to-cell. Therefore, in collaboration with the team of Pr Déglon (Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, CHUV, Lausanne), we designed LVs encoding the different Tau isoforms with the tag V5 and injected rats with it. Interestingly, all isoforms are transferred from the injection site to distant brain areas, independently of the presence of 3 or 4 microtubule binding domains (figure 28).

A recent study showed in a model of mice overexpressing human P301S Tau that the misfolding of Tau is precocious (MC1 conformation) and appears before the hyperphosphorylation AT8 (Holmes *et al*, 2014). In our rat model, Tau pathology appears progressively and we therefore wondered if we could reproduce this molecular cascade. We investigated the appearance of AT8 and MC1 epitopes and it is interesting to notice that the order of event is different if a mutated or a wild-type Tau is overexpressed. Indeed, we are able to reproduce this cascade when a mutated Tau is overexpressed (3R or 4R, P332S or P301L) because the MC1 immunolabelling is more expanded than AT8 (figure 29B). Contrarily, when a wild type form of Tau is overexpressed, the epitope AT8 appears first in some regions, independently of a MC1 conformation (figure 5A of article 2, figure 29A). We therefore suggest, even if the results are preliminary, that the pathological processes that take place for mutated or wild-type Tau proteins could be different. These results are consistent with studies showing that the fibrillogenesis and nucleation for mutated Tau are quicker and the fibers have variable biochemical properties (Chang *et al*, 2008; Frost *et al*, 2009b). However, further studies are needed to confirm this data.

In term of secretion of Tau via the extracellular vesicles, we evidenced the presence of Tau in exosomes and ectosomes but we have not demonstrated the transfer of Tau via these vesicles. In order to know if Tau could be transferred via these vesicles, we stably expressed a membranous GFP (mGFP) in Hela cells (figure 30A-B) and purified extracellular vesicles from the media of this cell line. We then incubated the vesicles with naive cells and we show by confocal microscopy the presence of membranous GFP in the secondary cells showing that the vesicles are able to join secondary cells (figure 30C-D). When Tau (hTau1N4RV5) is overexpressed, in this cell line, we can observe the transfer of Tau proteins in the secondary cells more efficiently via ectosomes than exosomes (figure 30E-F) probably reflecting the small amount of exosomes internalized by receiving cells. This data showed that ectosomes are efficient intercellular carriers for Tau proteins.

In addition with those results, we also highlighted the presence of Tau proteins in

ectosomes and exosomes purified from plasma and CSF retrieved from our model of NHP at several time points post LVs injection with an interesting increased of Tau-positive vesicles 7 months post-injection (figure 31). We also wanted to compare the secretion of Tau in vesicles purified from the interstitial fluid of WT or mutated Tau overexpressing rats. Interestingly, Tau is significantly more secreted via ectosomes in WT-Tau overexpressing rats than in P301L-Tau overexpressing rats (figure 32). On the other side, the poor number of exosomes positive for Tau does not allow to demonstrate a significant difference of secretion.

As documented in article 3 and in several studies, Tau proteins are retrieved free in the extracellular medium, non-associated with extracellular vesicles (Article 4) (Santa-Maria *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015; Plouffe *et al*, 2012). This presence is now accepted but the mechanisms explaining such a secretion are unknown. Tau is a cytoplasmic protein therefore its secretion via the conventional secretory pathway is unlikely. We wondered if Tau protein could have fusogenic properties and we initiated a collaborative study with teams led by Pr Römer (Center for Biological Signalling Studies, BIOSS, Freiburg, Germany) and Dr Melki (Neuro-PSI, CNRS, Paris Saclay). The aim of this study was to determine the behaviour of Tau in the presence of artificial membranes (Giant Unilamellar Vesicles, GUVs). Recombinant and fluorescent soluble 1N4R Tau proteins were incubated with GUVs reproducing the composition of the external plasma membrane. GUVs were visualized by confocal microscopy in order to observe the behaviour of Tau protein but also the behaviour of membranes (for procedures, see (Römer *et al*, 2010)). This experiment was performed only once and is not therefore conclusive but allows us to highlight several interesting data: 1) Tau proteins don't seem to cross this membrane as no proteins are seen inside the liposomes (figure 33A), 2) It is likely that Tau induce by itself invagination of membranes as intra-liposomal vesicles can be visualized (figure 33B). However, this phenomenon can also occur when the osmolarity of the solution is not respected and the experiment must be reproduced to definitely confirm this data, 3) Tau proteins do not seem to interact by itself with this type of membrane as no enrichment can be observed as seen with a protein linking the membrane (Shiga toxin; figure 33C) and finally, 4) Interestingly, in some small liposomes, highly fluorescent and dense inclusions of Tau are observed coherently with Tau aggregation. We can notice that these inclusions are never independent of membranes and are only present in small liposomes suggesting that a high curvature of the membrane is compulsory for the formation of such structures (figure 33D). We must precise once more that this experiment is only suggestive and deserves more investigations particularly to test the reproducibility, but also to separate liposomes in a size dependent manner, to change the

composition of membranes (in order to test the effect on the internal membrane for instance but also the implication of the insertion of structures similar to lipid rafts in the liposomes), and finally to test several protein species (particularly Tau aggregates).

DISCUSSION GENERALE

Dans trois tauopathies sporadiques, la MA, la PSP et l'AGD, la pathologie Tau semble évoluer de manière stéréotypée (figures 12-13-14) en suivant les connexions neuronales. Depuis les années 90 et la première description des stades d'évolution dans la MA par Braak et Braak (Braak & Braak, 1991), les mécanismes expliquant ces évolutions stéréotypées sont restés méconnus et de nombreuses hypothèses ont été émises. Ainsi, certains auteurs ont incriminé la vulnérabilité des cellules malades ou se sont encore posés la question de l'implication du peptide amyloïde (Rebeck & Hyman, 1993; Hardy, 1992). Cependant, ces hypothèses se sont heurtées à différents contre-exemples et aucune n'explique que l'évolution de la pathologie dans le cerveau suit des connexions neuronales bien définies. En parallèle, Prusiner et collaborateurs ont décrit pour la première fois qu'une protéine pouvait être un agent pathogène : le prion (Prusiner, 1982). Des recherches intensives ont suivi cette étude permettant la description de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine d'une propagation active de la pathologie de cellule en cellule (Pour revues : Walker *et al*, 2006; Aguzzi & Calella, 2009). Ce n'est que dans les années 2000 que plusieurs auteurs se sont alors demandés si le prion est la seule protéine à être un agent pathogène. Plusieurs études ont testé les caractéristiques de protéines impliquées dans d'autres pathologies neurodégénératives comme la synucléine ou le peptide amyloïde. Ainsi, ces études ont montré *in vitro* comme *in vivo* que ces protéines sont capables de transmettre la pathologie dans certaines conditions (Pour revues : (Walker *et al*, 2006; Frost & Diamond, 2009; Jucker & Walker, 2013)). A la suite de ces études, l'hypothèse que la pathologie Tau soit aussi capable de se propager activement a été émise. Ainsi, depuis 2009, plusieurs études ont montré que la pathologie Tau est transmissible, dans des modèles murins, d'un individu à un autre après injection de protéines Tau pathologiques (lysats de cerveaux, agrégats synthétiques, oligomères) (Clavaguera *et al*, 2009; Iba *et al*, 2013; Clavaguera *et al*, 2013a; Lasagna-Reeves *et al*, 2012a; Ahmed *et al*, 2014; Clavaguera *et al*, 2014; Peeraer *et al*, 2015; Stancu *et al*, 2015). Mais la transmissibilité ne reflète pas forcément une propagation active des protéines pathologiques donc plusieurs équipes indépendantes ont alors cherché à décrypter les mécanismes potentiellement impliqués dans cette propagation. Ainsi, plusieurs études utilisant des modèles d'étude avec des protéines Tau pro-agrégatives particulières (protéines mutées et/ou tronquées) ont confirmées que certaines protéines Tau sont capables de se déplacer de cellule en cellule et de propager ainsi la pathologie par un mécanisme de « seeding » (Kfoury *et al*, 2012; Liu *et al*, 2012; de Calignon *et al*, 2012; Holmes *et al*, 2014; Sanders *et al*, 2014). Ces modèles d'études nous ont apporté la preuve de concept que des mécanismes actifs de propagation de la pathologie Tau sont susceptibles d'exister. Cependant,

pour représenter plus fidèlement les mécanismes en jeu dans les tauopathies sporadiques, nous nous sommes affranchis des capacités pro-agrégatives des protéines Tau utilisées dans les études précédentes et avons mis au point un modèle de rat basé sur la surexpression locale de protéines Tau sauvages non tronquées. Dans ce modèle, nous avons été capables de reproduire la progression spatio-temporelle de la pathologie Tau, depuis le site d'initiation jusqu'à des régions distantes dans lesquelles il n'y a pas de surexpression de protéine Tau (figure 25, article 2 figure 5). Ces résultats suggèrent donc bien l'existence d'un mécanisme de propagation active de la pathologie Tau. A l'instar de la pathologie humaine, cette propagation suit les connections neuronales (article 2 figure 6) ce qui confirme des données de la littérature (de Calignon *et al*, 2012; Ahmed *et al*, 2014; Stancu *et al*, 2015) et suggère un mécanisme trans-synaptique. Cette hypothèse est renforcée par une étude *in vitro* montrant que la présence de synapses potentialise la propagation de la pathologie Tau (Calafate *et al*, 2015). Cependant, si de nombreuses études décrivent que des protéines Tau pathologiques sont présentes au niveau synaptique (Tai *et al*, 2012; 2014), personne n'a démontré, à ce jour, que la propagation de la protéine Tau passe par la synapse. Lors de l'analyse des connexions neuronales du site d'initiation de la pathologie dans notre modèle (Cenquizca & Swanson, 2007), nous avons remarqué de manière intéressante que la pathologie Tau ne propage pas dans toutes les populations cellulaires connectées au site d'initiation. C'est particulièrement frappant dans l'amygdale, qui est pourtant une région temporale très proche du site d'initiation mais dans laquelle nous n'avons pas détecté de neurones atteints par la pathologie Tau. Ces résultats suggèrent que certaines populations cellulaires sont plus vulnérables que d'autres, ce qui est également décrit dans la pathologie humaine mais reste pour le moment inexplicé (Hyman, 2014). Nous pouvons alors nous demander si la composition en protéines Tau des différentes populations cellulaires pourrait être à l'origine de ces vulnérabilités et notamment la distribution en isoformes. En effet, physiologiquement chez l'homme, si dans le cerveau complet le ratio d'isoformes 3R/4R est équimolaire, il apparaît que la composition en isoformes varie de population cellulaire en population cellulaire (Goedert *et al*, 1989b). Comme indiqué précédemment, selon les tauopathies, le contenu en isoformes des protéines Tau agrégées varie. Ainsi, dans la MA, les six isoformes de protéine Tau sont présentes dans les agrégats alors que dans la maladie de Pick, seules les isoformes 3R s'agrègent et que dans la PSP, l'AGD ou la CBD, seules les isoformes 4R s'agrègent. En plus de compositions variables en isoformes des agrégats, ces pathologies évoluent très différemment dans le cerveau. Nous avons alors surexprimé différentes isoformes de protéines Tau dans notre modèle de rats et montré que les comportements pathologiques des isoformes 3R et 4R

diffèrent. En effet, les morphologies des lésions histopathologiques sont variables avec en majorité des NFTs générés par la surexpression d'isoformes 4R alors que quand des isoformes 3R sont surexprimées, des structures de type corps de Pick apparaissent (figure 24). En terme de propagation, il est vraiment intéressant de constater que, dans notre modèle, la pathologie induite par la surexpression des protéines Tau sauvages 3R reste limitée aux alentours du site d'injection et n'évolue pas dans des régions distantes contrairement à ce qui est observé avec des isoformes 4R (article 3 figure 1). Ces résultats sont cohérents avec l'existence de plusieurs souches de protéines Tau pathologiques qui auraient des comportements différents en terme de propagation mais également en terme de seeding. Cela pourrait en partie expliquer les morphologies lésionnelles dissemblables comme suggéré par des études récentes (Clavaguera *et al*, 2013a; Sanders *et al*, 2014). Par contre, nous pouvons nous demander pourquoi ces variabilités de propagation existent dans notre modèle et quelle(s) différence(s) moléculaire(s) entre les isoformes 3R et 4R peuvent les expliquer. Il est ainsi possible qu'il existe un recrutement spécifique des isoformes 3R par les isoformes 3R comme suggéré par plusieurs études (Siddiqua & Margittai, 2010; Nonaka *et al*, 2010). A ce propos, il est à noter que chez le rat, la répartition en isoformes est différente de chez l'homme avec une proportion plus importante d'isoformes 4R (Bullmann *et al*, 2007). Dans notre modèle cependant, nous n'avons, à ce jour, pas d'évidence d'un mécanisme de seeding avec un recrutement de protéines Tau endogènes murines. Il pourrait être intéressant de tester notre modèle chez la souris KO-Tau par exemple ou chez la souris hTau pour tester si le comportement en terme de propagation est le même ou non. Nous avons par ailleurs récemment initié une étude en collaboration avec l'équipe du Dr Melki (Neuro-PSI, CNRS, Paris Saclay) qui va nous permettre de directement tester *in vivo*, dans notre modèle, le seeding des différentes espèces de Tau sauvages afin de déterminer s'il existe des spécificités en terme de seeding. Par ailleurs, il est intéressant de constater que les isoformes 3R ont été décrites comme étant plus agrégatives que les isoformes 4R (Schweers *et al*, 1995). Il est alors possible que la formation d'agrégats bloque la propagation d'espèces pathologiques de protéines Tau vers des régions distantes. Cette hypothèse est d'autant plus renforcée que quand des protéines mutées et donc intrinsèquement pro-agrégatives, qu'il s'agisse d'isoforme 3R ou d'isoformes 4R, sont surexprimées, nous constatons également une évolution de la pathologie restreinte au site d'injection (article 2 figure 5, article 3 figure 1, figure 25). Ces données confirment que les différentes espèces de Tau présentent des comportements variables en terme de morphologie des lésions mais également en terme de propagation. Il est aussi possible que selon les espèces de Tau, isoformes ou mutantes, les

structures fibrillaires soient différentes comme cela a été suggéré par Frost et collaborateurs (Frost *et al*, 2009b). Nos données soulignent également les limites de l'utilisation de formes mutées pour modéliser les tauopathies et notamment pour comprendre les mécanismes de propagation de la pathologie au regard de tauopathies sporadiques. Il est en effet difficile à la vue de nos données d'extrapoler à la maladie d'Alzheimer les résultats d'études effectuées avec des constructions mutées et/ou tronquées. Pour conclure sur cette partie de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle de tauopathie sporadique dans lequel la pathologie se met en place progressivement et se propage dans le système cérébral en suivant des connexions neuroanatomiques. Cependant, il est important de préciser que ce modèle est long à se mettre en place (analyse 5 à 8 mois post-injection des LVs) et que certains aspects de la pathologie ne sont pas reproduits comme l'apparition de marquage après imprégnation argentique, par exemple, probablement du fait de la surexpression d'une protéine Tau sauvage. De plus, les neurones immunopositifs pour l'anticorps AT100, restent présents uniquement autour du site d'injection même s'ils sont de plus en plus nombreux au fil des mois. Ces données nous indiquent que si nous reproduisons une évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau, nous ne parvenons pas, avec ce système, à modéliser les stades tardifs de la pathologie. Nous pouvons ainsi nous demander si la propagation de l'hyperphosphorylation observée dans notre modèle est bien une propagation de la pathologie Tau et si les épitopes pathologiques tardifs comme le marquage AT100 sont susceptibles d'apparaître dans les zones secondaires telles les zones olfactives. Cette donnée est difficile à vérifier car après 8 mois d'injection, les rats vieillissent et des DNF spontanées apparaissent chez les témoins rendant l'analyse difficile. Ces paramètres sont donc à prendre en compte dans l'analyse des données présentées dans cette thèse. Par ailleurs, nous pouvons nous questionner sur l'impact des populations de cellules gliales dans nos modèles. En effet, nous avons retrouvé, chez certains animaux, des lésions gliales (données non montrées) qui sont similaires aux astrocytes en touffes, plaques astrocytaires, ou encore aux corps bobinés retrouvés dans les pathologies humaines comme la PSP ou la CBD. Nous ne savons pas quelle est la part de cette pathologie gliale dans ces tauopathies. Il se peut que cette pathologie gliale soit indépendante et non liée aux mécanismes de propagation de la pathologie Tau mais personne, à ce jour, n'a étudié l'implication des cellules gliales, particulièrement au sein de la synapse tripartite, dans la propagation de la protéine Tau. Les cellules gliales pourraient également, de par leur rôle de médiatrices de l'activité neuronale, potentialiser ou inhiber la propagation de la pathologie Tau comme cela est suggéré par certains auteurs (Calafate *et al*, 2015; Pooler *et al*, 2013a; Yamada *et al*, 2014).

Outre une transmissibilité par un mécanisme de seeding et de conversion protéique d'un état physiologique à un état pathologique, ainsi qu'une évolution séquentielle de la pathologie, l'hypothèse de départ selon laquelle la protéine Tau agirait comme un prion dans les tauopathies requiert qu'il existe un/des mécanisme(s) actif(s) de transfert des protéines pathologiques d'une cellule à une autre. Si beaucoup d'études ont montré la transmission de la pathologie, peu ont investigué le transfert de la protéine Tau *in vivo*. Seuls les modèles d'expression conditionnelle de la protéine Tau mutée en P301L dans le cortex entorhinal présentés par les équipes du Pr Hyman et du Dr Duff montrent un transfert de la pathologie Tau dans l'hippocampe (Liu *et al*, 2012; de Calignon *et al*, 2012). Cependant, outre l'utilisation d'une protéine Tau mutée, une fuite du transgène dans l'hippocampe peut être détectée ce qui rend ces modèles caduques pour l'analyse du transfert de la protéine (Yetman *et al*, 2015). Notre modèle est ainsi le premier modèle démontrant *in vivo* qu'une protéine Tau sauvage humaine peut être transférée de neurone à neurone sur de longues distances (article 2 figures 2-3) confirmant ainsi des données préalables obtenues *in vitro* (Frost *et al*, 2009a). Il est intéressant de constater que si la pathologie Tau n'est pas transférée de manière distante quand des protéines Tau 3R et/ou mutées sont surexprimées, les protéines Tau sont tout de même transférées dans des proportions similaires à celles observées pour les protéines Tau sauvage 4R (figures 26 et 28). De plus, il apparaît que les protéines Tau transférées sont en grande majorité déphosphorylées et très probablement solubles (article 2 figure 7, figure 27) ce qui rejoint les observations faites dans le modèle de l'équipe du Pr Hyman (Polydoro *et al*, 2014). Ces données suggèrent donc fortement qu'il existe un transfert physiologique de la protéine Tau de cellule à cellule qui ne soit pas forcément relié à la pathologie. Ce mécanisme reflète probablement une nouvelle fonction de la protéine Tau aujourd'hui complètement inexplorée. Il conviendrait notamment de caractériser les espèces de protéines Tau transférées pour comprendre pourquoi les protéines Tau mutées ou 3R transférées dans des zones secondaires distantes ne présentent pas du tout d'épitopes pathologiques contrairement aux protéines 4R sauvages. Il semble aussi important d'étudier l'effet des protéines transférées sur les populations cellulaires cibles : les protéines Tau vont-elles, par exemple, mener à l'activation de caspases qui pourraient induire la formation de NFTs (de Calignon *et al*, 2010) ou mener à des déficits synaptiques (Polydoro *et al*, 2014)? Ou loin de la pathologie, être des médiateurs physiologiques synaptiques ou nucléaires (Ittner *et al*, 2010; Violet *et al*, 2014)?

Les protéines Tau étant transférées de cellule en cellule, le(s) mécanisme(s) cellulaire(s) permettant ce transfert reste(nt) méconnu(s). En effet, plusieurs hypothèses peuvent être émises (figure 16) mais, à ce jour, les protéines Tau n'ont été identifiées que dans des

vésicules extracellulaires de types exosomes (Saman *et al*, 2012; Simón *et al*, 2012a, article 4 figures 2 et 4) ou ectosomes (article 4 figures 2 et 4) ainsi que libres dans le milieu extracellulaire, *in vitro* (Fauré *et al*, 2006; Santa-Maria *et al*, 2012; Karch *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015, article 4 figure 2D) ainsi qu'*in vivo* (Yamada *et al*, 2011; 2014, article 4 figure 6, figures 31-32). Nous démontrons dans cette partie du travail de thèse que, dans nos modèles, la protéine Tau est sécrétée dans les exosomes uniquement dans des cas de surexpression ce qui est cohérent avec une étude de l'équipe du Dr Avila (Simón *et al*, 2012b). Par contre, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, nous démontrons que la protéine Tau est sécrétée de manière physiologique dans les ectosomes. Au contraire des exosomes, nous démontrons également pour la première fois que les protéines Tau peuvent être transférées de cellule en cellule via ces vésicules extracellulaires (figure 30). Cependant, la voie majoritaire de sécrétion de la protéine Tau semble être la sécrétion libre dans le milieu (article 4 figure 2D). Longtemps, la mort cellulaire a été incriminée comme étant responsable de manière passive de la présence de protéines Tau extracellulaires notamment dans le LCR. Cependant, il semble que la présence de Tau dans le LCR ne soit pas corrélée avec la mort cellulaire. Ainsi, l'augmentation de la concentration de protéines Tau dans le LCR observée dans la MA se fait avant les premiers signes de mort cellulaire. De plus, le pic de concentration de protéines dans le LCR apparaît avant le stade de Braak VI, stade auquel la mort cellulaire est à son paroxysme. Enfin, dans certaines tauopathies comme les FTDP-17 dans lesquelles la mort cellulaire est très importante, les concentrations en protéines Tau restent faibles (Hall & Saman, 2012; Grossman *et al*, 2005, article 3 figure 3). Toutes ces données suggèrent qu'un mécanisme actif de sécrétion de protéines Tau libres existe. Cependant, les mécanismes expliquant la sortie de protéines Tau libres dans le milieu et leurs entrées dans les cellules receveuses restent mystérieux et nous n'avons pour le moment pas d'évidence que la protéine Tau ait des propriétés fusogéniques (figure 33). Cette étude étant préliminaire, elle mériterait que nous la confirmions et que nous investiguions d'autres voies de sortie comme par exemple une sortie par la voie conventionnelle de l'exocytose. Cette dernière hypothèse a été relayée par une étude récente, même si elle reste très étonnante car la protéine Tau est cytoplasmique et ne passe pas par l'appareil de Golgi lors de sa maturation (Tang *et al*, 2015). Par ailleurs, pour l'instant, aucune étude n'a permis de déterminer si la sécrétion de la protéine Tau a un quelconque impact sur la propagation de la pathologie Tau. En effet, si de nombreuses études, dont la nôtre, pointent l'existence d'une sécrétion physiologique (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Karch *et al*, 2012), une sécrétion active menant à la propagation de la pathologie Tau n'a pas été démontrée. En utilisant leur système de protéine Tau pro-

agrégative, l'équipe du Dr Diamond a toutefois démontré qu'une immunodéplétion de Tau dans le milieu extracellulaire inhibait le transfert de cellule en cellule et le seeding dans la cellule receveuse (Kfoury *et al*, 2012). Il serait intéressant de pouvoir déterminer quelles sont les espèces de Tau qui vont être sécrétées via les différents mécanismes et aussi d'identifier s'il existe des récepteurs ou des partenaires spécifiques favorisant la présence de la protéine Tau dans les différents compartiments extracellulaires. Ensuite, nous pouvons imaginer qu'il existe des dérégulations de ces mécanismes de sécrétion durant la pathologie et que cela résulte en une sécrétion d'espèces pathologiques capables de répandre la pathologie Tau. La compréhension de ce sujet peut se révéler de tout premier ordre à des visées diagnostiques notamment s'il est possible d'identifier un type de sécrétion spécifique de stades précoces de la pathologie, phase à laquelle la prise en charge des patients est déterminante. Par ailleurs, déterminer les espèces pathologiques de protéines Tau se propageant pourrait permettre de concevoir des thérapies ciblées comme des immunothérapies pour bloquer l'évolution de la pathologie (Yanamandra *et al*, 2013; 2015; Castillo-Carranza *et al*, 2014; Troquier *et al*, 2012).

En conclusion, dans ce travail de thèse, nous avons abordé un bon nombre de questions relatives à la propagation de la protéine Tau. Nous avons d'abord réussi à démontrer dans plusieurs modèles que la protéine Tau se propage de cellule en cellule physiologiquement. Au delà de cet aspect physiologique, nous avons également réussi à modéliser pour la première fois, dans un modèle original de tauopathie sporadique chez le rat, une évolution spatio-temporelle de la pathologie Tau. De manière surprenante, il apparaît que cette évolution est dépendante de l'espèce de Tau responsable de la pathologie Tau. Ainsi, il semble qu'entre nos mains, les protéines Tau sauvage 4R induisent une pathologie Tau qui évolue bien plus loin que des protéines Tau 3R et/ou mutées. Ces résultats ont été obtenus en parallèle de plusieurs études sur le sujet, s'inscrivant dans une démarche globale de recherche sur la propagation physiologique et pathologique de la protéine Tau. Il est très important, au regard de ce travail de thèse mais aussi de la littérature, de dissocier les mécanismes physiologiques de sécrétion de la protéine Tau et les mécanismes d'évolution de la pathologie Tau. En effet, si souvent l'amalgame est fait, nous montrons de manière claire dans notre modèle de rat que la protéine Tau peut être physiologiquement transférée de neurone en neurone sans pour autant qu'il y ait de transfert de la pathologie. Ces résultats sont en adéquation avec des études montrant que la protéine Tau est sécrétée dans des modèles dans lesquels la pathologie n'est pas présente (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a).

En plus des perspectives thérapeutiques et diagnostiques évidentes, les études sur la propagation de la protéine Tau dans les tauopathies ont ouvert de grandes perspectives pour comprendre la physiopathologie des tauopathies mais peut être aussi de tout le groupe des protéinopathies. En effet, les pathologies neurodégénératives incluses dans ce groupe partagent de nombreux points communs notamment des propriétés de type prion, une autophagie et une réponse UPR (pour ‘unfolded protein response’) suractivées, une neuroinflammation importante ainsi qu’une augmentation du stress oxydatif. Toutes ces caractéristiques communes avec d’autres protéinopathies, notamment en terme de propagation, pourraient donner naissance à des projets de recherche transversaux ainsi que des thérapeutiques communes.

Pour faire le bilan des propriétés de type prion de la protéine Tau, il semble qu’elle soit effectivement l’unité de transmission unique de la pathologie (Clavaguera *et al*, 2009), qu’elle soit capable de recruter des protéines endogènes dans des fibres bien structurées de type amyloïde par un mécanisme de « seeding » et d’induire ainsi un changement conformationnel (Friedhoff *et al*, 1998; Frost *et al*, 2009b; Sanders *et al*, 2014). Il existe un mécanisme de transfert de la protéine Tau de cellule en cellule mais pour le moment, personne n’a présenté d’évidences conclusives d’un transfert de fibres de protéines Tau sauvages mal-conformées allant recruter des protéines endogènes dans les cellules secondaires. Il pourrait être intéressant d’utiliser des systèmes intégrés type *Caenorhabditis elegans* ou des zebrafish pour visualiser dans un système intégré simplifié et transparent ce type de mécanisme (Nussbaum-Krammer *et al*, 2013). Finalement, même si de gros travaux de caractérisation sont nécessaires, il existe des souches de protéines Tau en terme de conformation mais aussi de comportement *in vivo*. Par contre, en comparaison avec le prion, il n’y a pas d’évidence de transmission latérale de la pathologie Tau d’individu à individu (Irwin *et al*, 2013).

Globalement, au delà de la sémantique, type prion ou pas type prion, assez d’évidences ont été rassemblées depuis 2009 pour affirmer qu’une réelle propagation de la protéine Tau et de la pathologie Tau existe. Celle-ci a été confirmée dans de multiples études utilisant des modèles divers et variés. Cependant, si beaucoup d’équipes de recherche travaillent sur le sujet, en témoigne le nombre de présentations sur le sujet aux congrès récents, la recherche sur la propagation de la protéine Tau semble « s’étouffer » avec beaucoup d’études reproduisant les résultats précédents mais n’apportant que peu de nouveautés. Il est ainsi frappant et dommage de constater qu’il n’y a, à ce jour, que très peu de données mécanistiques sur le sujet, beaucoup d’auteurs prenant pour acquis les dogmes en place qui n’ont pas forcément été vérifiés de manière conclusive. Par contre, beaucoup d’équipes

commencent à valoriser les résultats sur la propagation de Tau pour mettre au point de nouvelles thérapies. Des résultats souvent obtenus avec des modèles contestables et non-reproduits par ailleurs. Peut-on ainsi vraiment se permettre d'essayer de cibler un mécanisme que l'on ne connaît pas ? Les risques ne sont-ils pas trop importants pour le patient ? Cette question légitime doit être posée et, je le pense, mérite réflexion. Et même si le traitement des patients doit être un objectif ultime pour la recherche sur les tauopathies, il est certainement important de prendre le temps de caractériser correctement les mécanismes physiopathologiques, de continuer à imaginer et d'émettre de nouvelles hypothèses, quitte à faire des erreurs et se tromper.

*“Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs n'a jamais tenté d'innover,,
Albert Einstein*

GENERAL DISCUSSION

In three sporadic tauopathies, AD, PSP and AGD, Tau pathology seems to evolve in a stereotypical manner (figures 12-13-14) following neuronal connections. From the 90s and the first description of these stages for AD by Braak and Braak (Braak & Braak, 1991), the mechanisms explaining this stereotyped evolution remained unknown and several hypothesis has been raised. Some authors had incriminated the vulnerability of affected cells or had questioned the implication of the beta-amyloid peptide (Rebeck & Hyman, 1993; Hardy, 1992). However, these hypotheses faced various counterexamples and no one was able to explain that the pathology is following well-defined neuronal connections. In parallel, Prusiner and coworkers had described for the first time that one protein could be a pathogen: the prion (Prusiner, 1982). Intensive researches followed and allowed for the description of several cellular and molecular mechanisms at the origin of an active propagation of the pathology from cell-to-cell (for review: (Walker *et al*, 2006; Aguzzi & Calella, 2009)). At the beginning of the years 2000, several authors wondered if the prion is the only protein to be a pathogen. As proteins like synuclein or beta-amyloid peptide share common features with prion proteins, several studies had tested their characteristics and showed *in vitro* and *in vivo* that these proteins are able to transmit the pathology in specific conditions (For review: (Walker *et al*, 2006; Frost & Diamond, 2009; Jucker & Walker, 2013)). Following these studies, one has been hypothesized that Tau pathology is also able to actively propagate. Consequently, since 2009, several studies showed that Tau pathology is transmissible from one individual to another in murine models following the injection of pathological Tau proteins (brain lysates, synthetic aggregates, oligomers) (Clavaguera *et al*, 2009; Iba *et al*, 2013; Clavaguera *et al*, 2013a; Lasagna-Reeves *et al*, 2012a; Ahmed *et al*, 2014; Clavaguera *et al*, 2014; Peeraer *et al*, 2015; Stancu *et al*, 2015). But transmissibility does not necessarily reflect an active propagation of pathological proteins therefore several independent teams tried to determine the potential mechanisms implicated in this propagation. Many studies using overexpression of particular pro-aggregative Tau proteins (mutated and/or truncated) had confirmed that the ability of some Tau proteins to move from cell-to-cell and in this way, to propagate Tau pathology by a mechanism of seeding (Kfoury *et al*, 2012; Liu *et al*, 2012; de Calignon *et al*, 2012; Holmes *et al*, 2014; Sanders *et al*, 2014). These models brought the proof of concept that active propagation of Tau pathology may exist. However, in order to describe accurately the mechanisms of Tau propagation in sporadic tauopathies, we avoided the use of pro-aggregative Tau species and we designed a new rat model based on the focal overexpression of full-length wild-type Tau proteins. In this model we were able to reproduce the spatiotemporal evolution of Tau pathology, from the initiation site to distant brain areas in

which there is no expression of Tau (figure 25, article 2 figure 5). These results suggest the existence of a mechanism of active Tau pathology propagation. In line with the human pathologies, this propagation follows the neuronal connections (article 2 figure 6) confirming the data from other studies (de Calignon *et al*, 2012; Ahmed *et al*, 2014; Stancu *et al*, 2015) and suggesting a trans-synaptic mechanism. This hypothesis is strengthened by an *in vitro* study showing that the presence of synapses potentiates the Tau pathology propagation (Calafate *et al*, 2015). However, if several studies describe the presence of pathological Tau proteins in the synapse (Tai *et al*, 2012; 2014), nobody demonstrated, to date, the passage of Tau propagation by the synapse. Analysing the neuronal connections from the initiation site of Tau pathology in our model (Cenquizca & Swanson, 2007), we noticed interestingly that Tau pathology was not propagating in every cell populations connected to the initiation site. This is particularly true for amygdala, a temporal region close to the initiation site but in which we never detected NFD. These results suggest that some cell populations are more vulnerable than others which is also described in human pathologies but remains unexplained (Hyman, 2014). We then wondered if the composition in Tau proteins of the different cell populations and particularly the distribution in isoforms could be the cause of these vulnerabilities. Indeed, physiologically in humans, although the global ratio of isoforms 3R/4R is equimolar, it appears that this composition may vary from cell population to another (Goedert *et al*, 1989b). As indicated previously, depending on tauopathies, the content in isoforms of Tau aggregates vary. Indeed, in AD, the six isoforms are present in aggregates whereas in Pick's disease, only the 3R-Tau aggregates and in PSP, AGD and CBD, only 4R-Tau aggregates. In addition of the variable isoform compositions of aggregates, these pathologies evolve very differently in the brain. We then overexpressed different Tau isoforms in our rat model and show that the pathological behaviours of isoforms 3R and 4R are different. Indeed, the morphology of the histopathological lesions is variable with a great majority of NFTs generated by the overexpression of 4R-Tau whereas when 3R-Tau are overexpressed, Pick bodies-like structures appear (figure 24). In term of propagation, it is very interesting to highlight that, in our model, the pathology induced by the overexpression of 3R-Tau is limited to the vicinity of the injection site and is not evolving in distant brain areas contrarily with 4R-Tau mediated Tau pathology (article 3, figure 1). These results are consistent with the existence of several strains of pathological Tau proteins that may have differential propagation and seeding propensity. This data could partly explain the morphological differences of the lesions as suggested by recent studies (Clavaguera *et al*, 2013a; Sanders *et al*, 2014). But one may ask why these variabilities in propagation exist in

our model and what molecular properties of 3R and 4R Tau could explain such differences? It is possible that a specific recruitment of 3R isoforms by 3R isoforms occur as suggested in two studies (Siddiqua & Margittai, 2010; Nonaka *et al*, 2010). In this regard, we must notice that in rats, contrary to humans, the ratio 3R/4R is different with a higher proportion of 4R-Tau isoforms (Bullmann *et al*, 2007). However, to date in our model, we have no evidence of a seeding mechanism with the recruitment of murine endogenous Tau. It would be interesting to test our model in KO-Tau mice or hTau mice for instance in order to test if the propagation is similar or not in those models. We recently initiated a collaborative study with the team led by Dr Melki (Neuro-PSI, CNRS, Paris Saclay) that will allow us to directly test *in vivo*, in our model the seeding properties of different species of wild-type Tau in order to determine if there are some seeding specificities. Moreover, it is interesting to remark that 3R-Tau were described as more aggregative than 4R-Tau (Schweers *et al*, 1995). It is therefore possible that the formation of aggregates is blocking the pathological species propagation of Tau proteins to distant brain regions. This hypothesis had been consolidated by the fact that when mutated 3R or 4R Tau proteins, intrinsically pro-aggregative, are overexpressed, we can also observe a pathological evolution restricted to the injection site (article 2 figure 5, article 3 figure 1, figure 25). This data confirm that different Tau species support variable behaviour in term of lesions morphologies but also in term of propagation. It is also possible that following the Tau species, isoforms or mutants, the structures of fibers are different as it has been suggested by Frost and coworkers (Frost *et al*, 2009b). Our data also highlights the limits of the use of mutated Tau to model tauopathies and particularly to understand the mechanisms of Tau pathology propagation in sporadic tauopathies. Indeed, seeing our results, it is particularly challenging to extrapolate for AD the results obtained with mutated and/or truncated constructs. To conclude this part of the PhD work, we developed a model of sporadic tauopathy with a progressive pathology propagating in the CNS following neuroanatomical connections. However, it is important to note that this model is long to establish (analysis 5 to 8 months post LVs injection) and that some aspects of Tau pathology are not reproduced probably due to the overexpression of a wild-type form of Tau like for instance the appearance of labelling after silver impregnation. Moreover, the AT100 immunopositive neurons are found only around the injection site although they are more and more numerous over the months. This data indicates that we do not manage, with our system, to model the late stages of the disease. We can therefore wonder whether the Tau hyperphosphorylation propagation observed in our model represents a pathological propagation and if the tardive pathological epitopes as AT100 are likely to appear in

secondary areas like olfactory regions. This data will be difficult to verify because after 8 months post-injection, rats get older and spontaneous NFD appears also in control animals making the analysis tricky. These parameters must be taken into account for the analysis of data presented in this thesis. Otherwise, one may ask the implication of glial cells in our models. Indeed, we retrieved, in some animals, glial lesions in our models (data not shown here) that are similar to tufted astrocytes, astrocytic plaques or coiled bodies retrieved in human pathologies like PSP or CBD. This glial pathology may appear independently of Tau pathology propagation but nobody studied, to date, the implication of glial cells, particularly through the tripartite synapse, in Tau protein propagation. Glial cells could also potentiate or inhibit Tau pathology propagation by their role in the neuronal activity mediation as suggested by different studies (Calafate *et al*, 2015; Pooler *et al*, 2013a; Yamada *et al*, 2014).

Besides the transmissibility by seeding and conversion of proteins from a physiological state to a pathological one, as well as a sequential evolution of Tau pathology, if Tau is a prion-like protein, it implicates the existence of one or several active mechanism(s) of cell-to-cell transfer of pathological proteins. Only few studies investigated the *in vivo* transfer of Tau proteins. Only the models developed by the teams of Pr Hyman and Dr Duff with a conditional expression of P301L-Tau in the entorhinal cortex show a transfer of Tau pathology in the hippocampus (Liu *et al*, 2012; de Calignon *et al*, 2012). However, in addition with the use of a mutated form of Tau, a leakage of the transgene to the hippocampus exists avoiding the proper analysis of the protein transfer (Yetman *et al*, 2015). Our model is therefore the first to show *in vivo* that human wild-type Tau proteins are transferred from neuron-to-neuron over long distances (article 2 figures 2-3) confirming some data obtained *in vitro* (Frost *et al*, 2009a). It is also interesting to note that although Tau pathology is not transferred over long distance when 3R and/or mutated Tau is overexpressed, Tau proteins are transferred in similar proportions as those observed for 4R wild-type Tau (figures 26 et 28). Moreover, it appears that the transferred Tau proteins are mainly dephosphorylated and probably soluble (article 2 figure 7, figure 27) joining the observations done in the model of Pr Hyman's team (Polydoro *et al*, 2014). This data is therefore suggesting that a physiological transfer of Tau proteins from cell-to-cell, not necessarily related to pathological processes, may exist. This mechanism probably reflects a new function of Tau protein that is completely unexplored to date. It would be particularly interesting to characterize the species of Tau that are transferred to understand why the mutated or 3R transferred Tau proteins in distant secondary brain areas do not bear any pathological epitopes contrarily to wild-type 4R Tau. It may be important also to study the effect of the transferred Tau species on the secondary

cells: will the transferred Tau proteins lead to caspases activation that could induce the formation of NFTs (de Calignon *et al*, 2010)? Or lead to synaptic deficits (Polydoro *et al*, 2014)? Or, far from pathology, be synaptic or nuclear physiologic mediators (Ittner *et al*, 2010; Violet *et al*, 2014)?

Tau proteins are transferred from cell-to-cell but the cellular mechanism(s) allowing this transfer remain unknown. Indeed, several hypotheses may be issued (figure 16) but to date, Tau proteins were only identified in exosomes ((Saman *et al*, 2012; Simón *et al*, 2012a), article 4 figures 2 et 4) or ectosomes (article 4 figures 2 et 4) as well as free in the extracellular medium *in vitro* ((Fauré *et al*, 2006; Santa-Maria *et al*, 2012; Karch *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Tang *et al*, 2015), article 4 figure 2D) or *in vivo* ((Yamada *et al*, 2011; 2014), article 4 figure 6, figures 31-32). We demonstrated in this work that in our models, Tau proteins are secreted in exosomes only after overexpression, consistently with what is observed by a study from Dr Avila's team (Simón *et al*, 2012b). However, whether *in vivo* or *in vitro*, we saw that Tau proteins are secreted physiologically within ectosomes. Contrarily to exosomes, we also demonstrated for the first time that Tau proteins might be transferred from cell-to-cell via extracellular vesicles (figure 30). However, the major secretory pathway for Tau protein seems to be the free secretion in the extracellular medium (article 4 figure 2D). For a long time, cell death was incriminated to be passively responsible of the presence of extracellular Tau proteins particularly in the CSF. However, it seems that the presence of Tau in the CSF is not correlated to cell death. Indeed, the increase of Tau proteins concentration in the CSF observed during AD appears before the first signs of cell death. Moreover, the peak of concentration of Tau proteins in the CSF appears before the Braak stage VI, stage at which cell death is at its peak. Finally, in some tauopathies like FTDP-17 in which cell death is very important, the concentrations of Tau proteins remain weak ((Hall & Saman, 2012; Grossman *et al*, 2005), article 3 figure 3). All this data suggests that an active secretion of free Tau proteins exists. However, the mechanisms explaining this secretion of free Tau in the medium and their re-entry in receiving cells remains puzzling and for the moment we don't have evidence that Tau could be fusogenic (figure 33). This study is preliminary and must be confirmed by further investigation. We should also investigate other secretory pathways like the conventional exocytosis, even if this mechanism would be particularly surprising in the case of Tau proteins (Tang *et al*, 2015).

Otherwise, to date, no study had determined if Tau protein secretion has an impact on Tau pathology propagation. Although several studies, including ours, point out the existence of physiological secretion (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a; Karch *et al*, 2012), an active

secretion leading to the propagation of Tau pathology had never been described. Nevertheless, using their system of pro-aggregative Tau proteins, the team led by Dr Diamond demonstrated that an immunodepletion of Tau in the extracellular medium inhibit the cell-to-cell transfer of Tau and the subsequent seeding in the receiving cell (Kfoury *et al*, 2012). It would be interesting to determine which species of Tau are secreted via the different mechanisms and also to identify receptors or specific partners favouring the presence of Tau proteins in the different extracellular compartments. Then, we can imagine that some deregulations of secretion mechanisms exist during the pathology resulting in the secretion of pathological species able to spread Tau pathology. Understanding this may be interesting for diagnosis purposes particularly if it is possible to identify a specific secretion for precocious pathological stages, phase to which the care of patients is crucial. Also, to determine the pathological species of propagating Tau proteins would allow the design of targeted therapies like immunotherapies aimed to block the evolution of the pathology (Yanamandra *et al*, 2013; 2015; Castillo-Carranza *et al*, 2014; Troquier *et al*, 2012).

As a conclusion, in this PhD work, we discussed a number of issues related to the propagation of tau protein. We firstly managed to demonstrate in several models that Tau proteins are propagating from cell to cell physiologically. Besides the physiological aspect, we managed to model for the first time a spatiotemporal spreading of Tau pathology in an original model of sporadic tauopathy in rats. Surprisingly, this spreading appears to be dependant of the Tau species responsible for Tau pathology. Therefore, it seems that, in our hands, wild-type 4R-Tau proteins induce Tau pathology that evolve farther than 3R and/or mutated Tau proteins. These results were obtained in parallel of several studies on the subject and are part of a global research initiative on the physiological and pathological spread of Tau proteins. It is very important, in view of this thesis but also of the literature to dissociate the physiological mechanisms of Tau proteins secretion and the mechanisms of Tau pathology evolution. Although the amalgam is often made, we clearly show in our rat model that Tau proteins can be physiologically transferred from neuron-to-neuron without necessarily a transfer of pathology. These results are consistent with studies showing that Tau proteins are secreted in models with no Tau pathology (Chai *et al*, 2012; Pooler *et al*, 2013a).

In addition to evident therapeutic and diagnostic outcome, the studies on Tau propagation in tauopathies opened great perspectives to understand the pathophysiology of tauopathies but maybe also the pathophysiology of proteinopathies. Indeed, the neurodegenerative pathologies included in this group share common features particularly for prion-like properties, overactivated autophagy and unfolded protein response, important

neuroinflammation as well as an oxidative stress increase. All these common characteristics particularly in term of propagation could lead to transversal research projects and joint therapies.

To sum-up on the prion-like properties of Tau, it seems (1) that Tau is the unique transmission unit of Tau pathology (Clavaguera *et al*, 2009), (2) that Tau is able to recruit endogenous proteins in well-structured amyloid fibers by a seeding mechanism and induce a conformational change (Friedhoff *et al*, 1998; Frost *et al*, 2009b; Sanders *et al*, 2014). A transfer mechanism of Tau protein from cell-to-cell seems to exist but for the moment, nobody conclusively demonstrated the transfer of misfolded wild-type Tau fibrils able to recruit endogenous proteins in secondary cells. It could be interesting to use systems like *Caenorhabditis elegans* or zebrafishes to visualise in an integrated, simplified and transparent system that type of mechanisms (Nussbaum-Krammer *et al*, 2013). Finally, even if major characterizations are needed, strains of Tau in term of conformation but also of *in vivo* behaviour seem to exist. However, in comparison with prion diseases, there is no evidence of lateral case-to-case transmission of Tau pathology from one individual to another (Irwin *et al*, 2013).

Globally, besides the semantic of prion-like or not prion-like, enough evidence was brought, from 2009, to confirm that a real propagation of Tau proteins and of Tau pathology exists. This was confirmed in many studies using variable models. However, although many research groups are working on this trendy subject, reflected by the number of oral presentations on this subject at recent congresses, the research on Tau propagation seems to “suffocate” with many studies reproducing previous results bringing only few innovations. It is striking and disappointing that there are very few mechanistic data on this subject, many authors assume the dogmas established for the subject and that were not necessarily conclusively verified. However, many teams began to validate their results (often obtained in questionable models and not yet reproduced elsewhere) on Tau propagation to set up new therapies. Can we really allow ourselves to try to target a mechanism that we don’t know truly? Are the risks not too important for the patients? This question should be asked and, I think, deserves consideration. And even the treatment of patients must be an ultimate objective for the research on tauopathies, it is certainly important to take the time to properly characterize the pathophysiological mechanisms, to continue to imagine and issue some hypotheses, even if it means to make mistakes.

“A person who never made a mistake never tried anything new.,

Albert Einstein

REFERENCES

A

- Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J & Binder LI (2000) C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell. Sci.* **113 Pt 21**: 3737–3745
- Adams SJ, DeTure MA, McBride M, Dickson DW & Petrucelli L (2010) Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. *PLoS ONE* **5**: e10810
- Aguzzi A & Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol. Rev.* **89**: 1105–1152
- Aguzzi A & Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* **64**: 783–790
- Ahmed Z, Cooper J, Murray TK, Garn K, McNaughton E, Clarke H, Parhizkar S, Ward MA, Cavallini A, Jackson S, Bose S, Clavaguera F, Tolnay M, Lavenir I, Goedert M, Hutton ML & O'Neill MJ (2014) A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: the pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathol.* **127**: 667–683
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG & Goedert M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J. Neurosci.* **22**: 9340–9351
- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS & Iqbal K (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 298–303
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJA & Cooper JM (2011) Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* **42**: 360–367
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phy-chish-Gerichtliche Medizin, Berlin* **64**: 146–148
- Amadoro G, Corsetti V, Sancesario GM, Lubrano A, Melchiorri G, Bernardini S, Calissano P & Sancesario G (2014) Cerebrospinal fluid levels of a 20-22 kDa NH2 fragment of human tau provide a novel neuronal injury biomarker in Alzheimer's disease and other dementias. *J. Alzheimers Dis.* **42**: 211–226
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1739**: 91–103
- Andreadis A, Broderick JA & Kosik KS (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3585–3593
- Andreadis A, Brown WM & Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* **31**: 10626–10633
- Aoyagi H, Hasegawa M & Tamaoka A (2007) Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau but not wild-type tau. *J. Biol. Chem.* **282**: 20309–20318
- Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Nonaka T, Hasegawa M, Ishiguro K, Iritani S, Tsuchiya K, Iseki E, Yagishita S, Oda T & Mochizuki A (2004) Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal

- degeneration. *Ann. Neurol.* **55**: 72–79
- Ariza M, Kolb HC, Moechars D, Rombouts F & Andrés JI (2015) Tau Positron Emission Tomography (PET) Imaging: Past, Present, and Future. *J. Med. Chem.* **58**: 4365–4382
- Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE, Bak TH, Bhatia KP, Borroni B, Boxer AL, Dickson DW, Grossman M, Hallett M, Josephs KA, Kertesz A, Lee SE, Miller BL, Reich SG, Riley DE, Tolosa E, Tröster AI, Vidailhet M & Weiner WJ (2013) Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* **80**: 496–503
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR & Van Hoesen GW (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* **1**: 103–116
- Arrasate M, Pérez M & Avila J (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem. Res.* **25**: 43–50
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET & Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 631–639
- Ashman JB, Hall ES, Eveleth J & Boekelheide K (1992) Tau, the neuronal heat-stable microtubule-associated protein, is also present in the cross-linked microtubule network of the testicular spermatid manchette. *Biol. Reprod.* **46**: 120–129
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow E-M & Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **103**: 26–35

B

- Ballatore C, Lee VM-Y & Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 663–672
- Bancher C, Braak H, Fischer P & Jellinger KA (1993) Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* **162**: 179–182
- Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K & Wisniewski HM (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **477**: 90–99
- Barghorn S, Davies P & Mandelkow E (2004) Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on beta-structure in the core domain. *Biochemistry* **43**: 1694–1703
- Barghorn S, Zheng-Fischhöfer Q, Ackmann M, Biernat J, Bergen von M, Mandelkow EM & Mandelkow E (2000) Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* **39**: 11714–11721
- Barré P & Eliezer D (2006) Folding of the repeat domain of tau upon binding to lipid surfaces. *J. Mol. Biol.* **362**: 312–326
- Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, Sultan A, Troquier L, Leboucher A, Caillierez R, Grosjean M-E, Demeyer D, Obriot H, Brion I, Barbot B, Galas M-C, Staels B, Humez S, Sergeant N, Schraen-Maschke S, et al (2011) Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol. Dis.* **43**: 486–494
- Ben Haim L, Ceyzériat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Aurégan G, Guillermier M, Ruiz M, Petit F, Houitte D, Faivre E, Vandesquille M, Aron-Badin R, Dhenain M, Déglon N, Hantraye P, Brouillet E, Bonvento G & Escartin C (2015) The JAK/STAT3

- pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J. Neurosci.* **35**: 2817–2829
- Bergen von M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM & Mandelkow E (2001) Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J. Biol. Chem.* **276**: 48165–48174
- Bergen von M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM & Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 5129–5134
- Berger A, Lorain S, Joséphine C, Desrosiers M, Peccate C, Voit T, Garcia L, Sahel J-A & Bemelmans A-P (2015) Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* **23**: 918–930
- Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M & Crowther RA (2003) Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 9034–9038
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM & Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* **11**: 153–163
- Binder LI, Frankfurter A & Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* **101**: 1371–1378
- Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P, Cherrier M, Kaye J, Payami H, Peskind E, Lampe TH, Nemens E, Boyer PJ & Schellenberg GD (1999) A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain* **122** (Pt 4): 741–756
- Boeve BF (2011) The multiple phenotypes of corticobasal syndrome and corticobasal degeneration: implications for further study. *J. Mol. Neurosci.* **45**: 350–353
- Borroni B, Gardoni F, Parnetti L, Magno L, Malinverno M, Saggese E, Calabresi P, Spillantini MG, Padovani A & Di Luca M (2009) Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. *Neurobiol. Aging* **30**: 34–40
- Borroni B, Malinverno M, Gardoni F, Alberici A, Parnetti L, Premi E, Bonuccelli U, Grassi M, Perani D, Calabresi P, Di Luca M & Padovani A (2008) Tau forms in CSF as a reliable biomarker for progressive supranuclear palsy. *Neurology* **71**: 1796–1803
- Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, Madiona K, Olieric V, Böckmann A, Meier BH & Melki R (2013) Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* **4**: 2575
- Boutin H, Prenant C, Maroy R, Galea J, Greenhalgh AD, Smigova A, Cawthorne C, Julyan P, Wilkinson SM, Banister SD, Brown G, Herholz K, Kassiou M & Rothwell NJ (2013) [18F]DPA-714: direct comparison with [11C]PK11195 in a model of cerebral ischemia in rats. *PLoS ONE* **8**: e56441
- Braak H & Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**: 239–259
- Braak H & Braak E (1998) Argyrophilic grain disease: frequency of occurrence in different age categories and neuropathological diagnostic criteria. *J Neural Transm* **105**: 801–819
- Braak H & Del Tredici K (2011a) The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol.* **121**: 171–181
- Braak H & Del Tredici K (2011b) Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta Neuropathol.* **121**: 589–595
- Braak H & Del Tredici K (2013) Evolutional aspects of Alzheimer's disease pathogenesis. *J.*

Alzheimers Dis. **33 Suppl 1**: S155–61

- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I & Iqbal K (1986) Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci. Lett.* **65**: 351–355
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH & Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**: 197–211
- Braak H, Thal DR, 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
- Brandt R, Léger J & Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* **131**: 1327–1340
- Bretteville A, Ando K, Ghestem A, Loyens A, Bégard S, Beauvillain J-C, Sergeant N, Hamdane M & Buée L (2009) Two-dimensional electrophoresis of tau mutants reveals specific phosphorylation pattern likely linked to early tau conformational changes. *PLoS ONE* **4**: e4843
- Brion J-P, Passareiro H, Nunez J & Flament-Durand J (1985) Mise en évidence Immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol. Bruxelles* **95**: 229–235
- Buée L & Delacourte A (1999) Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* **9**: 681–693
- Buée L, Bussièrre T, Buée-Scherrer V, Delacourte A & Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33**: 95–130
- Bugiani O, Mancardi GL, Brusa A & Ederli A (1979) The fine structure of subcortical neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* **45**: 147–152
- Bullmann T, de Silva R, Holzer M, Mori H & Arendt T (2007) Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* **17**: 98–102
- Bullmann T, Holzer M, Mori H & Arendt T (2009) Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int. J. Dev. Neurosci.* **27**: 591–597
- Bussièrre T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin ML, Perl DP, Buée L & Delacourte A (1999) Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol.* **97**: 221–230
- Butler M & Shelanski ML (1986) Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation. *J. Neurochem.* **47**: 1517–1522
- Butner KA & Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* **115**: 717–730

C

- Caccamo A, Oddo S, Tran LX & LaFerla FM (2007) Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am. J. Pathol.* **170**: 1669–1675
- Caceres A & Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**: 461–463
- Caceres A, Potrebic S & Kosik KS (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* **11**: 1515–1523
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IRA, Neumann M, Lee VM-Y, Hatanpaa KJ, White CL, Schneider JA, Grinberg LT, Halliday G, Duyckaerts C, Lowe JS, Holm IE, Tolnay M,

- Okamoto K, Yokoo H, Murayama S, Woulfe J, Munoz DG, Dickson DW, et al (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. In pp 5–22. Springer-Verlag
- Calafate S, Buist A, Miskiewicz K, Vijayan V, Daneels G, de Strooper B, de Wit J, Verstreken P & Moechars D (2015) Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Rep* **11**: 1176–1183
- Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Lasagna-Reeves CA, Gerson JE, Singh G, Estes DM, Barrett ADT, Dineley KT, Jackson GR & Kaye R (2014) Passive immunization with Tau oligomer monoclonal antibody reverses tauopathy phenotypes without affecting hyperphosphorylated neurofibrillary tangles. *J. Neurosci.* **34**: 4260–4272
- Canquiza LA & Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* **56**: 1–26
- Chai X, Dage JL & Citron M (2012) Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol. Dis.* **48**: 356–366
- Chang E, Kim S, Yin H, Nagaraja HN & Kuret J (2008) Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps. *J. Neurochem.* **107**: 1113–1123
- Chapin SJ & Bulinski JC (1992) Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cell Motil. Cytoskeleton* **23**: 236–243
- Chen F, David D, Ferrari A & Götz J (2004) Posttranslational modifications of tau—role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targets* **5**: 503–515
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ & Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**: 674–677
- Chen N-N, Luo D-J, Yao X-Q, Yu C, Wang Y, Wang Q, Wang J-Z & Liu G-P (2012) Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats. *J. Alzheimers Dis.* **30**: 585–594
- Chen WT, Liu WK & Yen SH (1994) Expression of tau exon 8 in different species. *Neurosci. Lett.* **172**: 167–170
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J & Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci* **9**: 124
- Cho J-H & Johnson GVW (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J. Neurochem.* **88**: 349–358
- Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, Woo HN, Kwon YK, Kim HH, Gwag BJ, Mook-Jung IH & Jung YK (2001) Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol. Dis.* **8**: 162–172
- Clark LN, Poorkaj P, Wszolek Z, Geschwind DH, Nasreddine ZS, Miller B, Li D, Payami H, Awert F, Markopoulou K, Andreadis A, D'Souza I, Lee VM, Reed L, Trojanowski JQ, Zhukareva V, Bird T, Schellenberg G & Wilhelmsen KC (1998) Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 13103–13107
- Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, Probst A, Winkler DT, Reichwald J, Staufenbiel M, Ghetti B, Goedert M & Tolnay M (2013a) Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. **110**: 9535–9540

- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M & Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* **11**: 909–913
- Clavaguera F, Hench J, Goedert M & Tolnay M (2015) Invited review: Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**: 47–58
- Clavaguera F, Hench J, Lavenir I, Schweighauser G, Frank S, Goedert M & Tolnay M (2014) Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **127**: 299–301
- Clavaguera F, Lavenir I, Falcon B, Frank S, Goedert M & Tolnay M (2013b) ‘Prion-like’ templated misfolding in tauopathies. *Brain Pathol.* **23**: 342–349
- Cleveland DW, Hwo SY & Kirschner MW (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* **116**: 227–247
- Cleveland DW, Hwo SY & Kirschner MW (1977b) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* **116**: 207–225
- Couchie D & Nunez J (1985) Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for the immature brain. *FEBS Lett.* **188**: 331–335
- Crowther RA (1991) Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 2288–2292
- Cruz JC, Tseng H-C, Goldman JA, Shih H & Tsai L-H (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* **40**: 471–483

D

- D'Souza I & Schellenberg GD (2002) tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J. Biol. Chem.* **277**: 26587–26599
- D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD & Schellenberg GD (1999) Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 5598–5603
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI & Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell. Sci.* **114**: 1179–1187
- Dayanandan R, Van Slegtenhorst M, Mack TG, Ko L, Yen SH, Leroy K, Brion JP, Anderton BH, Hutton M & Lovestone S (1999) Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett.* **446**: 228–232
- de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL & Hyman BT (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* **464**: 1201–1204
- de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL & Hyman BT (2012) Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* **73**: 685–697
- Delacourte A & Defossez A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* **76**: 173–186
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Watzet A, Vermersch P, Ghozali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H & Di Menza C (1999) The biochemical pathway

- of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **52**: 1158–1165
- Deramecourt V, Lebert F, Maurage C-A, Fernandez-Gomez F-J, Dujardin S, Colin M, Sergeant N, Buée-Scherrer V, Clot F, Ber IL, Brice A, Pasquier F & Buée L (2012) Clinical, neuropathological, and biochemical characterization of the novel tau mutation P332S. *J. Alzheimers Dis.* **31**: 741–749
- Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Demeyer D, Carrier S, Buée-Scherrer V, Blum D, Vinh J, Sergeant N, Verdier Y, Buée L & Hamdane M (2015) Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep* **5**: 9659
- Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E & Lee S-J (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 13010–13015
- DeTure M, Ko L-W, Easson C & Yen S-H (2002a) Tau assembly in inducible transfectants expressing wild-type or FTDP-17 tau. *Am. J. Pathol.* **161**: 1711–1722
- DeTure MA, Di Noto L & Purich DL (2002b) In vitro assembly of Alzheimer-like filaments. How a small cluster of charged residues in Tau and MAP2 controls filament morphology. *J. Biol. Chem.* **277**: 34755–34759
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE & Holzbaur ELF (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* **319**: 1086–1089
- Díaz-Hernández M, Gómez-Ramos A, Rubio A, Gómez-Villafuertes R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT & Avila J (2010) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J. Biol. Chem.* **285**: 32539–32548
- Dotti CG, Banker GA & Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* **23**: 121–130
- Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow EM & Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**: 297–308
- Drubin D, Kobayashi S & Kirschner M (1986) Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **466**: 257–268
- Drubin DG & Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* **103**: 2739–2746
- Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas M-C, Bousset L, Melki R, Aurégan G, Hantraye P, Brouillet E, Buée L & Colin M (2014a) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS ONE* **9**: e100760
- Dujardin S, Colin M & Buée L (2015) Invited review: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**: 59–80
- Dujardin S, Lécolle K, Caillierez R, Bégard S, Zommer N, Lachaud C, Carrier S, Dufour N, Aurégan G, Winderickx J, Hantraye P, Déglon N, Colin M & Buée L (2014b) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 14
- Dumanchin C, Camuzat A, Champion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, Saugier-veber P, Martin C, Penet C, Charbonnier F, Agid Y, Frebourg T & Brice A (1998) Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 1825–1829
- Duyckaerts C (2011) Tau pathology in children and young adults: can you still be

unconditionally baptist? *Acta Neuropathol.* **121**: 145–147

Duyckaerts C, Benneceib M, Grignon Y, Uchihara T, He Y, Piette F & Hauw JJ (1997) Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol. Aging* **18**: 267–273

E

Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L & Vekrellis K (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* **30**: 6838–6851

Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J & Hernández F (2006) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.* **99**: 1445–1455

Ennulat DJ, Liem RK, Hashim GA & Shelanski ML (1989) Two separate 18-amino acid domains of tau promote the polymerization of tubulin. *J. Biol. Chem.* **264**: 5327–5330

Espinoza M, de Silva R, Dickson DW & Davies P (2008) Differential incorporation of tau isoforms in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **14**: 1–16

F

Falcon B, Cavallini A, Angers R, Glover S, Murray TK, Barnham L, Jackson S, O'Neill MJ, Isaacs AM, Hutton ML, Szekeres PG, Goedert M & Bose S (2015) Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J. Biol. Chem.* **290**: 1049–1065

Farah CA, Perreault S, Liazoghli D, Desjardins M, Anton A, Lauzon M, Paiement J & Leclerc N (2006) Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**: 710–724

Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M & Cattaneo A (2000) The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J. Neurochem.* **75**: 624–633

Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J & Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**: 642–648

Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H & Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 9683–9688

Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Federoff HJ, Miller BL & Goetzl EJ (2015) Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement* **11**: 600–607.e1

Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K & Brahic M (2012) Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* **72**: 517–524

Friedhoff P, Bergen von M, Mandelkow EM, Davies P & Mandelkow E (1998) A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 15712–15717

Frost B & Diamond MI (2009) The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. *Prion* **3**: 74–77

Frost B & Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat.*

Rev. Neurosci. **11**: 155–159

- Frost B, Jacks RL & Diamond MI (2009a) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* **284**: 12845–12852
- Frost B, Ollesch J, Wille H & Diamond MI (2009b) Conformational diversity of wild-type Tau fibrils specified by templated conformation change. *J. Biol. Chem.* **284**: 3546–3551
- Furukawa Y, Kaneko K & Nukina N (2011) Tau protein assembles into isoform- and disulfide-dependent polymorphic fibrils with distinct structural properties. *J. Biol. Chem.* **286**: 27236–27246

G

- Galimberti D, Dell'Osso B, Altamura AC & Scarpini E (2015) Psychiatric Symptoms in Frontotemporal Dementia: Epidemiology, Phenotypes, and Differential Diagnosis. *Biol. Psychiatry*
- Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung* **19**: 1–8
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI & Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10032–10037
- Garg S, Timm T, Mandelkow E-M, Mandelkow E & Wang Y (2011) Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiol. Aging* **32**: 1–14
- Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J & Shelanski ML (1993) Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J. Cell. Sci.* **105 (Pt 3)**: 729–737
- Georgieva ER, Xiao S, Borbat PP, Freed JH & Eliezer D (2014) Tau binds to lipid membrane surfaces via short amphipathic helices located in its microtubule-binding repeats. *Biophys. J.* **107**: 1441–1452
- Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC & Goedert M (2015) Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**: 24–46
- Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, Ichimiya Y, Porro M, Perini F, Kitamoto T, Tateishi J, Seiler C, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Prelli F, Goedert M, Dlouhy SR & Tagliavini F (1996) Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 744–748
- Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM & Matthews WB (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**: 388–389
- Glatz DC, Rujescu D, Tang Y, Berendt FJ, Hartmann AM, Faltraco F, Rosenberg C, Hulette C, Jellinger K, Hampel H, Riederer P, Möller H-J, Andreadis A, Henkel K & Stamm S (2006) The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **96**: 635–644
- Goedert M & Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* **9**: 4225–4230
- Goedert M, Clavaguera F & Tolnay M (2010) The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **33**: 317–325

- Goedert M, Jakes R & Crowther RA (1999) Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett.* **450**: 306–311
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ & Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* **8**: 159–168
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D & Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**: 519–526
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J & Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* **8**: 393–399
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE & Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 4051–4055
- Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L & Feinstein SC (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* **8**: 353–365
- Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, Chenouard N, de Chaumont F, Martino A, Enninga J, Olivo-Marin J-C, Männel D & Zurzolo C (2009) Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat. Cell Biol.* **11**: 328–336
- Götz J & Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**: 532–544
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K & Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* **14**: 1304–1313
- Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, Moore P, Van Deerlin V, Pratico D, Clark CM, Coslett HB, Chatterjee A, Gee J, Trojanowski JQ & Lee VM-Y (2005) Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **57**: 721–729
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS & Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **261**: 6084–6089
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM & Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4913–4917
- Gu Y, Oyama F & Ihara Y (1996) Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* **67**: 1235–1244
- Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Wang T, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW & Binder LI (2005) Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **26**: 1015–1022
- Guntern R, Bouras C, Hof PR & Vallet PG (1992) An improved thioflavine S method for staining neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Experientia* **48**: 8–10
- Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C & LeBlanc AC (2004) Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **165**: 523–531
- Guo JL & Lee VM-Y (2011) Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives

pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J. Biol. Chem.* **286**: 15317–15331

H

- Hall GF & Patuto BA (2012) Is tau ready for admission to the prion club? *Prion* **6**: 223–233
- Hall GF & Saman S (2012) Death or secretion? The demise of a plausible assumption about CSF-tau in Alzheimer Disease? *Commun Integr Biol* **5**: 623–626
- Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC & Jucker M (2012) The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathol.* **123**: 31–37
- Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung K-Y, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA & Anderton BH (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**: 23645–23654
- Hanger DP, Lau DHW, Phillips EC, Bondulich MK, Guo T, Woodward BW, Pooler AM & Noble W (2014) Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *J. Alzheimers Dis.* **40 Suppl 1**: S37–45
- Hanisch K, Soininen H, Alafuzoff I & Hoffmann R (2010) Analysis of human tau in cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* **9**: 1476–1482
- Hara M, Hirokawa K, Kamei S & Uchihara T (2013) Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol.* **125**: 565–579
- Hardy J (1992) An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **15**: 200–201
- Hasegawa M, Smith MJ & Goedert M (1998) Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett.* **437**: 207–210
- Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DMA, Saito Y & Murayama S (2014) 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **127**: 303–305
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW & Martin DW (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1381–1388
- Hirokawa N, Shiomura Y & Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol.* **107**: 1449–1459
- Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, Ouidja MO, Brodsky FM, Marasa J, Bagchi DP, Kotzbauer PT, Miller TM, Papy-Garcia D & Diamond MI (2013) Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: E3138–47
- Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades WC, Belaygorod L, Cairns NJ, Holtzman DM & Diamond MI (2014) Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: E4376–85
- Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ & Lee VM (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* **282**: 1914–1917
- Hrnkova M, Zilka N, Minichova Z, Koson P & Novak M (2007) Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. *Brain Res.* **1130**: 206–213
- Hu X, Crick SL, Bu G, Frieden C, Pappu RV & Lee J-M (2009) Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. **106**: 20324–20329

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, et al (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**: 702–705

Hyman BT (2014) Tau propagation, different tau phenotypes, and prion-like properties of tau. *Neuron* **82**: 1189–1190

I

Iba M, Guo JL, McBride JD, Zhang B, Trojanowski JQ & Lee VM-Y (2013) Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J. Neurosci.* **33**: 1024–1037

Ihara Y, Nukina N, Miura R & Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* **99**: 1807–1810

Ikeda K, Akiyama H, Kondo H, Haga C, Tanno E, Tokuda T & Ikeda S (1995) Thorn-shaped astrocytes: possibly secondarily induced tau-positive glial fibrillary tangles. *Acta Neuropathol.* **90**: 620–625

Ingelsson M, Vanmechelen E & Lannfelt L (1996) Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci. Lett.* **220**: 9–12

Ingelsson M, Ramasamy K, Cantuti-Castelvetri I, Skoglund L, Matsui T, Orne J, Kowa H, Raju S, Vanderburg CR, Augustinack JC, de Silva R, Lees AJ, Lannfelt L, Growdon JH, Frosch MP, Standaert DG, Irizarry MC & Hyman BT (2006) No alteration in tau exon 10 alternative splicing in tangle-bearing neurons of the Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol.* **112**: 439–449

Inouye H, Sharma D, Goux WJ & Kirschner DA (2006) Structure of core domain of fibril-forming PHF/Tau fragments. *Biophys. J.* **90**: 1774–1789

Irwin DJ, Abrams JY, Schonberger LB, Leschek EW, Mills JL, Lee VM-Y & Trojanowski JQ (2013) Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurol* **70**: 462–468

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ & Lee VM (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* **24**: 751–762

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E & Götz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**: 387–397

J

Jancsik V, Filliol D, Felter S & Rendon A (1989) Binding of microtubule-associated proteins (MAPs) to rat brain mitochondria: a comparative study of the binding of MAP2, its microtubule-binding and projection domains, and tau proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **14**: 372–381

Jarrett JT & Lansbury PT (1993) Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**: 1055–1058

Jaworski T, Dewachter I, Lechat B, Croes S, Termont A, Demedts D, Borghgraef P, Devijver H, Filipkowski RK, Kaczmarek L, Kügler S & Van Leuven F (2009) AAV-tau mediates pyramidal neurodegeneration by cell-cycle re-entry without neurofibrillary tangle formation in wild-type mice. *PLoS ONE* **4**: e7280

- Jeganathan S, Bergen von M, Brutlach H, Steinhoff H-J & Mandelkow E (2006) Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* **45**: 2283–2293
- Jellinger KA (2006) Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *J Neural Transm* **113**: 1603–1623
- Jicha GA, Bowser R, Kazam IG & Davies P (1997a) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J. Neurosci. Res.* **48**: 128–132
- Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Hoffmann R & Davies P (1997b) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **69**: 2087–2095
- Johnson GV, Seubert P, Cox TM, Motter R, Brown JP & Galasko D (1997) The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *J. Neurochem.* **68**: 430–433
- Jones EM, Dubey M, Camp PJ, Vernon BC, Biernat J, Mandelkow E, Majewski J & Chi EY (2012) Interaction of tau protein with model lipid membranes induces tau structural compaction and membrane disruption. *Biochemistry* **51**: 2539–2550
- Jucker M & Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**: 45–51

K

- Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ, Bian F, Durham RA, Schwarz RD, Roher AE & Walker LC (2000) Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J. Neurosci.* **20**: 3606–3611
- Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M & Amos LA (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* **22**: 70–77
- Karch CM, Jeng AT & Goate AM (2012) Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *J. Biol. Chem.* **287**: 42751–42762
- Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH & Younkin SG (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **24**: 3801–3809
- Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM & Diamond MI (2012) Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J. Biol. Chem.* **287**: 19440–19451
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**: 192–193
- Kim W, Lee S & Hall GF (2010a) Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS Lett.* **584**: 3085–3088
- Kim W, Lee S, Jung C, Ahmed A, Lee G & Hall GF (2010b) Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ. *J. Alzheimers Dis.* **19**: 647–664
- Kovacs GG (2015) Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**: 3–23
- Kowal J, Tkach M & Théry C (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**: 116–125
- Ksiezak-Reding H, Farooq M, Yang L-S, Dickson DW & LoPresti P (2003) Tau protein expression in adult bovine oligodendrocytes: functional and pathological significance. *Neurochem. Res.* **28**: 1385–1392

- Ksiezak-Reding H, Liu WK & Yen SH (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* **597**: 209–219
- Kuchibhotla KV, Wegmann S, Kopeikina KJ, Hawkes J, Rudinskiy N, Andermann ML, Spires-Jones TL, Bacskai BJ & Hyman BT (2014) Neurofibrillary tangle-bearing neurons are functionally integrated in cortical circuits in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 510–514
- Künze G, Barré P, Scheidt HA, Thomas L, Eliezer D & Huster D (2012) Binding of the three-repeat domain of tau to phospholipid membranes induces an aggregated-like state of the protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**: 2302–2313

L

- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR & Kaye R (2012a) Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep* **2**: 700
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR & Kaye R (2012b) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **26**: 1946–1959
- Lavisse S, Inoue K, Jan C, Peyronneau MA, Petit F, Goutal S, Dauguet J, Guillemier M, Dollé F, Rbah-Vidal L, Van Camp N, Aron-Badin R, Remy P & Hantraye P (2015) [18F]DPA-714 PET imaging of translocator protein TSPO (18 kDa) in the normal and excitotoxically-lesioned nonhuman primate brain. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **42**: 478–494
- 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 τ pathology are independent of insulin resistance in τ transgenic mice. *Diabetes* **62**: 1681–1688
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L Jr, Trojanowski JQ (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science.* **251(4994)**: 675–678
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H & Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell. Sci.* **111 (Pt 21)**: 3167–3177
- Lee H-J, Patel S & Lee S-J (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.* **25**: 6016–6024
- Lee S, Kim W, Li Z & Hall GF (2012) Accumulation of vesicle-associated human tau in distal dendrites drives degeneration and tau secretion in an in situ cellular tauopathy model. *Int J Alzheimers Dis* **2012**: 172837–16
- Levanska L, Zilka N, Jadhav S, Neradil P & Novak M (2013) Of rodents and men: the mysterious interneuronal pilgrimage of misfolded protein tau in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **37**: 569–577
- Lewis SA, Wang DH & Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* **242**: 936–939
- Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow E-M, Biernat J & Mandelkow E (2011) Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J.* **30**: 4825–4837
- Liberski PP (2014) Prion, prionoids and infectious amyloid. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20 Suppl 1**: S80–4
- Lindwall G & Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **259**: 5301–5305
- Litvan I (1997) The clinical and pathologic hallmarks of progressive supranuclear palsy.

Curr. Opin. Neurol. **10**: 346–350

- Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C & Duff K (2012) Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS ONE* **7**: e31302
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP & Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 8422–8426
- LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP & Binder LI (1995) Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10369–10373
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ & Lee VM-Y (2012a) Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**: 949–953
- Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ & Lee VM-Y (2012b) Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.* **209**: 975–986
- Luo M-H, Tse S-W, Memmott J & Andreadis A (2004) Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J. Neurochem.* **90**: 340–351

M

- Maas T, Eidenmüller J & Brandt R (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **275**: 15733–15740
- Mailliot C, Sergeant N, Bussi re T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A & Bu e L (1998) Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett.* **433**: 201–204
- Mandelkow E, Bergen von M, Biernat J & Mandelkow E-M (2007) Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **17**: 83–90
- Maurage CA, Udd B, Ruchoux MM, Vermersch P, Kalimo H, Krahe R, Delacourte A & Sergeant N (2005) Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. *Neurology* **65**: 1636–1638
- McCarty DM (2008) Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther.* **16**: 1648–1656
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease (2001) Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch. Neurol.* **58**: 1803–1809
- McMillan PJ, Kraemer BC, Robinson L, Leverenz JB, Raskind M & Schellenberg G (2011) Truncation of tau at E391 promotes early pathologic changes in transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**: 1006–1019
- Mercken M, Vandermeeren M, L bke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, Martin JJ & Gheuens J (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol.* **84**: 265–272
- Meredith JE, Sankaranarayanan S, Guss V, Lanzetti AJ, Berisha F, Neely RJ, Slemmon JR, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Soares H, Ahljanian M & Albright CF (2013) Characterization of novel CSF Tau and ptau biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **8**: e76523
- Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret J-M, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC & Jucker M (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* **313**:

1781–1784

- Mirbaha H, Holmes BB, Sanders DW, Bieschke J & Diamond MI (2015) Tau trimers are the minimal propagation unit spontaneously internalized to seed intracellular aggregation. *J. Biol. Chem.*: jbc.M115.652693
- Mohamed N-V, Plouffe V, Rémillard-Labrosse G, Planel E & Leclerc N (2014) Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Sci Rep* **4**: 5715
- Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N & Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **287**: 32040–32053
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Vinters HV, Hyman BT, 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.* **123**: 1–11
- Morales R, Duran-Aniotz C, Castilla J, Estrada LD & Soto C (2012) De novo induction of amyloid- β deposition in vivo. *Mol. Psychiatry* **17**: 1347–1353
- Mougenot A-L, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchère J, Lakhdar L, Legastelois S & Baron T (2012) Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* **33**: 2225–2228
- Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A, Mears A, Drummond JA, Berg S, MacKay D, Asuni AA, Bhat R & Lovestone S (2004) GSK-3 β inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol. Psychiatry* **9**: 522–530
- Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E & Zweckstetter M (2009) Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* **7**: e34
- Mukrasch MD, Biernat J, Bergen von M, Griesinger C, Mandelkow E & Zweckstetter M (2005) Sites of tau important for aggregation populate β -structure and bind to microtubules and polyanions. *J. Biol. Chem.* **280**: 24978–24986
- Muñoz-Montañó JR, Moreno FJ, Avila J & Diaz-Nido J (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.* **411**: 183–188
- Müller R, Heinrich M, Heck S, Blohm D & Richter-Landsberg C (1997) Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res.* **288**: 239–249
- Mylonas E, Hascher A, Bernadó P, Blackledge M, Mandelkow E & Svergun DI (2008) Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* **47**: 10345–10353

N

- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM & Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* **387**: 271–280
- Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **19**: 983–997
- Noble W, Hanger DP, Miller CCJ & Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* **4**: 83
- Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T & Hasegawa M (2010) Seeded aggregation and toxicity

- of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* **285**: 34885–34898
- Novak M, Kabat J & Wischik CM (1993) Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J.* **12**: 365–370
- Nussbaum-Krammer CI, Park K-W, Li L, Melki R & Morimoto RI (2013) Spreading of a prion domain from cell-to-cell by vesicular transport in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **9**: e1003351
- ## P
- Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R & Baekelandt V (2015) α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*
- Peeraer E, Bottelbergs A, Van Kolen K, Stancu I-C, Vasconcelos B, Mahieu M, Duytschaever H, Ver Donck L, Torremans A, Sluydts E, Van Acker N, Kemp JA, Mercken M, Brunden KR, Trojanowski JQ, Dewachter I, Lee VM-Y & Moechars D (2015) Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **73**: 83–95
- Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau W-M, Mattson MP & Tycko R (2005) Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* **307**: 262–265
- Plouffe V, Mohamed N-V, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M & Leclerc N (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PLoS ONE* **7**: e36873
- Polydoro M, Dzhala VI, Pooler AM, Nicholls SB, McKinney AP, Sanchez L, Pitstick R, Carlson GA, Staley KJ, Spires-Jones TL & Hyman BT (2014) Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathol.* **127**: 257–270
- Pooler AM & Hanger DP (2010) Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 1012–1015
- Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W & Hanger DP (2013a) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* **14**: 389–394
- Pooler AM, Polydoro M, Wegmann S, Nicholls SB, Spires-Jones TL & Hyman BT (2013b) Propagation of tau pathology in Alzheimer's disease: identification of novel therapeutic targets. *Alzheimers Res Ther* **5**: 49
- Pooler AM, Usardi A, Evans CJ, Philpott KL, Noble W & Hanger DP (2012) Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol. Aging* **33**: 431.e27–38
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M & Schellenberg GD (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* **43**: 815–825
- Porzig R, Singer D & Hoffmann R (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**: 644–649
- Probst A, Tolnay M, Langui D, Goedert M & Spillantini MG (1996) Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta Neuropathol.* **92**: 588–596
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136–144
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 13363–13383

Prusiner SB (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* **47**: 601–623

Q

Qu M-H, Li H, Tian R, Nie C-L, Liu Y, Han B-S & He R-Q (2004) Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* **15**: 2723–2727

R

Rajendran L, Bali J, Barr MM, Court FA, Krämer-Albers E-M, Picou F, Raposo G, van der Vos KE, van Niel G, Wang J & Breakefield XO (2014) Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *J. Neurosci.* **34**: 15482–15489

Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P & Simons K (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 11172–11177

Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, van Swieten JC, Seelaar H, Dopper EGP, Onyike CU, Hillis AE, Josephs KA, Boeve BF, Kertesz A, Seeley WW, Rankin KP, Johnson JK, Gorno-Tempini M-L, Rosen H, Prioleau-Latham CE, et al (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* **134**: 2456–2477

Rebeck GW & Hyman BT (1993) Neuroanatomical connections and specific regional vulnerability in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **14**: 45–7– discussion 55–6

Reitz C & Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.* **88**: 640–651

Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP & Anderton BH (2008) Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* **283**: 18177–18186

Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT & Cotman CW (2004) Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J. Clin. Invest.* **114**: 121–130

Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW & Head E (2002) Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* **11**: 341–354

Rosseels J, Van den Brande J, Violet M, Jacobs D, Grognet P, Lopez J, Huvent I, Caldara M, Swinnen E, Papegaey A, Caillierez R, Buée-Scherrer V, Engelborghs S, Lippens G, Colin M, Buée L, Galas M-C, Vanmechelen E & Winderickx J (2015) Tau monoclonal antibody generation based on humanized yeast models: impact on Tau oligomerization and diagnostics. *J. Biol. Chem.* **290**: 4059–4074

Rossi G, Bastone A, Piccoli E, Mazzoleni G, Morbin M, Uggetti A, Giaccone G, Sperber S, Beeg M, Salmona M & Tagliavini F (2012) New mutations in MAPT gene causing frontotemporal lobar degeneration: biochemical and structural characterization. *Neurobiol. Aging* **33**: 834.e1–6

Römer W, Pontani L-L, Sorre B, Rentero C, Berland L, Chambon V, Lamaze C, Bassereau P, Sykes C, Gaus K & Johannes L (2010) Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell* **140**: 540–553

S

- Saito Y, Nakahara K, Yamanouchi H & Murayama S (2002) Severe involvement of ambient gyrus in dementia with grains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**: 789–796
- Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Tanaka N, Kakuta Y, Yamanouchi H & Murayama S (2004) Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**: 911–918
- Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NCY & Hall GF (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **287**: 3842–3849
- Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, Barker SJ, Foley AC, Thorpe JR, Serpell LC, Miller TM, Grinberg LT, Seeley WW & Diamond MI (2014) Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* **82**: 1271–1288
- Santa-Maria I, Varghese M, Ksiezak-Reding H, Dzhun A, Wang J & Pasinetti GM (2012) Paired helical filaments from Alzheimer disease brain induce intracellular accumulation of Tau protein in aggresomes. *J. Biol. Chem.* **287**: 20522–20533
- Schneider A, Biernat J, Bergen von M, Mandelkow E & Mandelkow EM (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **38**: 3549–3558
- Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J & Mandelkow E (1995) Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 8463–8467
- Schweers O, Schönbrunn-Hanebeck E, Marx A & Mandelkow E (1994) Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J. Biol. Chem.* **269**: 24290–24297
- Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow E-M, Song Y-H & Mandelkow E (2002) Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J.* **21**: 4896–4905
- Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I & Iqbal K (1998) Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**: 299–309
- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S & Buée L (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* **5**: 207–224
- Sergeant N, Bussièrè T, Vermersch P, Lejeune JP & Delacourte A (1995) Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport* **6**: 2217–2220
- Sergeant N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buée L, Lefranc D, Watzé A & Delacourte A (1997a) Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J. Neurochem.* **69**: 834–844
- Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Watzé A & Delacourte A (1997b) Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett.* **412**: 578–582
- Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Watzé A, Vermersch P & Delacourte A (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **10**:

2143–2155

- Sergeant N, Watzet A & Delacourte A (1999) Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively 'exon 10' isoforms. *J. Neurochem.* **72**: 1243–1249
- Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M & Hisanaga S-I (2012) Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **32**: 2430–2441
- Sibille N, Huvent I, Fauquant C, Verdegem D, Amniai L, Leroy A, Wieruszeski J-M, Lippens G & Landrieu I (2012) Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins* **80**: 454–462
- Siddiqua A & Margittai M (2010) Three- and Four-repeat Tau Coassemble into Heterogeneous Filaments AN IMPLICATION FOR ALZHEIMER DISEASE. *J. Biol. Chem.* **285**: 37920–37926
- Sigala J, Jumeau F, Caillet-Boudin M-L, Sergeant N, Ballot C, Rigot J-M, Marcelli F, Tardivel M, Buée L & Mitchell V (2014) Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J. Androl.* **16**: 927–928
- Sillen A, Leroy A, Wieruszeski J-M, Loyens A, Beauvillain J-C, Buée L, Landrieu I & Lippens G (2005) Regions of tau implicated in the paired helical fragment core as defined by NMR. *Chembiochem* **6**: 1849–1856
- Simón D, García-García E, Gómez-Ramos A, Falcón-Pérez JM, Díaz-Hernández M, Hernández F & Avila J (2012a) Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis* **10**: 73–75
- Simón D, García-García E, Royo F, Falcón-Pérez JM & Avila J (2012b) Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett.* **586**: 47–54
- Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB & Bonnefoy E (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell. Sci.* **119**: 2025–2034
- Spillantini MG & Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* **12**: 609–622
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A & Ghetti B (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7737–7741
- Spires-Jones TL & Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* **82**: 756–771
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R & Van Leuven F (2000) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275**: 41340–41349
- Stancu I-C, Vasconcelos B, Ris L, Wang P, Villers A, Peeraer E, Buist A, Terwel D, Baatsen P, Oyelami T, Pierrot N, Casteels C, Bormans G, Kienlen-Campard P, Octave J-N, Moechars D & Dewachter I (2015) Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **129**: 875–894
- Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL & Feany MB (2007a) Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol. Biol. Cell* **18**: 5060–5068

- Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow E-M & Feany MB (2007b) S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J. Neurosci. Res.* **85**: 1271–1278
- Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H & Reed Murtagh F (1995) An english translation of alzheimer's 1907 paper, “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde”. *Clinical Anatomy* **8**: 429–431
- Stöhr J, Watts JC, Mensinger ZL, Oehler A, Grillo SK, DeArmond SJ, Prusiner SB & Giles K (2012) Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**: 11025–11030
- Sultan A, Nesslany F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L & Galas M-C (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* **286**: 4566–4575
- Syme CD, Blanch EW, Holt C, Jakes R, Goedert M, Hecht L & Barron LD (2002) A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins. *Eur. J. Biochem.* **269**: 148–156

T

- Tai H-C, Serrano Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL & Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am. J. Pathol.* **181**: 1426–1435
- Tai H-C, Wang BY, Serrano Pozo A, Frosch MP, Spires-Jones TL & Hyman BT (2014) Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 146
- Takahashi M, Miyata H, Kametani F, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S-I & Hasegawa M (2015) Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol.*: 1–13
- Tang Z, Ioja E, Bereczki E, Hultenby K, Li C, Guan Z, Winblad B & Pei J-J (2015) mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**: 1646–1657
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P & Prusiner SB (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**: 2079–2082
- Thal DR, Rüb U, Orantes M & Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**: 1791–1800
- Tolnay M, Sergeant N, Ghestem A, Chalbot S, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Probst A & Delacourte A (2002) Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms. *Acta Neuropathol.* **104**: 425–434
- Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean M-E, Zommer N, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Blum D & Buée L (2012) Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THYTau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* **9**: 397–405

U

- Usardi A, Pooler AM, Seereeram A, Reynolds CH, Derkinderen P, Anderton B, Hanger DP, Noble W & Williamson R (2011) Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *FEBS J.* **278**: 2927–2937

V

- Vanier MT, Neuville P, Michalik L & Launay JF (1998) Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J. Cell. Sci.* **111** (Pt 10): 1419–1432
- Verny M, Duyckaerts C, Agid Y & Hauw JJ (1996) The significance of cortical pathology in progressive supranuclear palsy. Clinico-pathological data in 10 cases. *Brain* **119** (Pt 4): 1123–1136
- Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ & Gross SP (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 87–92
- Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nesslany F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L & Galas M-C (2014) A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci* **8**: 84
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ & Lee VM-Y (2011) Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **72**: 57–71

W

- Wagshal D, Sankaranarayanan S, Guss V, Hall T, Berisha F, Lobach I, Karydas A, Voltarelli L, Scherling C, Heuer H, Tartaglia MC, Miller Z, Coppola G, Ahlijanian M, Soares H, Kramer JH, Rabinovici GD, Rosen HJ, Miller BL, Meredith J, et al (2015) Divergent CSF τ alterations in two common tauopathies: Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **86**: 244–250
- Walker LC, Levine H, Mattson MP & Jucker M (2006) Inducible proteopathies. *Trends Neurosci.* **29**: 438–443
- Watanabe A, Hong W-K, Dohmae N, Takio K, Morishima-Kawashima M & Ihara Y (2004) Molecular aging of tau: disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* **90**: 1302–1311
- Wei ML & Andreadis A (1998) Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* **70**: 1346–1356
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY & Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 1858–1862
- Williams DR (2006) Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Intern Med J* **36**: 652–660
- Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ & Revesz T (2007) Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* **130**: 1566–1576
- Williamson R, Usardi A, Hanger DP & Anderton BH (2008) Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J.* **22**: 1552–1559
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W & Crowther RA (1988a) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 4884–4888
- Wisichik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M & Klug A (1988b) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 4506–4510
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ & Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau

(tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4040–4043

Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, Steinberg JI, Margittai M, Kaye R, Zurzolo C, Di Paolo G & Duff KE (2013) Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J. Biol. Chem.* **288**: 1856–1870

X

Xu J, Sato S, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Strunk E & Ikezu T (2010) Tau-tubulin kinase 1 enhances prefibrillar tau aggregation and motor neuron degeneration in P301L FTDP-17 tau-mutant mice. *FASEB J.* **24**: 2904–2915

Y

Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, Jiang H, Finn MB, Holmes BB, Binder LI, Mandelkow E-M, Diamond MI, Lee VM-Y & Holtzman DM (2011) In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J. Neurosci.* **31**: 13110–13117

Yamada K, Holth JK, Liao F, Stewart FR, Mahan TE, Jiang H, Cirrito JR, Patel TK, Hochgräfe K, Mandelkow E-M & Holtzman DM (2014) Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J. Exp. Med.* **211**: 387–393

Yanamandra K, Jiang H, Mahan TE, Maloney SE, Wozniak DF, Diamond MI & Holtzman DM (2015) Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* **2**: 278–288

Yanamandra K, Kfoury N, Jiang H, Mahan TE, Ma S, Maloney SE, Wozniak DF, Diamond MI & Holtzman DM (2013) Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. *Neuron* **80**: 402–414

Yetman MJ, Lillehaug S, Bjaalie JG, Leergaard TB & Jankowsky JL (2015) Transgene expression in the Nop-tTA driver line is not inherently restricted to the entorhinal cortex. *Brain Struct Funct*: 1–19

Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga S-I & Hasegawa M (2009) Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J. Biol. Chem.* **284**: 7940–7950

Yuyama K, Yamamoto N & Yanagisawa K (2008) Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J. Neurochem.* **105**: 217–224

Z

Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM-Y & Trojanowski JQ (2005) Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 227–231

Zhang W, Arteaga J, Cashion DK, Chen G, Gangadharmath U, Gomez LF, Kasi D, Lam C, Liang Q, Liu C, Mocharla VP, Mu F, Sinha A, Szardenings AK, Wang E, Walsh JC, Xia C, Yu C, Zhao T & Kolb HC (2012) A highly selective and specific PET tracer for imaging of tau pathologies. *J. Alzheimers Dis.* **31**: 601–612

Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Kwon I-S, Duong DM, Seyfried NT, Hu WT, Liu Z, Wang J-Z, Cheng L, Sun YE, Yu SP, Levey AI & Ye K (2014) Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **20**: 1254–1262

Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseikova E &

Novak M (2006) Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* **580**: 3582–3588

ANNEXES

Annexe 1 – Tau sequence

Exon 1				
10	20	30	40	50
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
Exon 2		Exon 3		
60	70	80	90	100
PTEDGSEEPG	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG
Exon 4		Exon 5		
110	120	130	140	150
TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK
Exon 7				
160	170	180	190	200
IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK	TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP
Exon 9				
210	220	230	240	250
GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK	SRLQTAPVPM
Exon 10				
260	270	280	290	300
PDLKNVKS KI	GSTENLKHQP	GGGK VQI INK	KLDLSN VQSK	CGSKDNIKHV
Exon 11				
310	320	330	340	350
PGGGS VQIVY	KPVDLSK VTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQ VEVK	SEKLD FKDRV
Exon 12				
360	370	380	390	400
QSKIGSLDNI	THVPGGN KK	IETHK LT FRE	NAKAK T DHGA	EIVYK S PVVS
Exon 13				
410	420	430	440	
GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L

Exon 1 : 1-44

Exon 2 : 45-73

Exon 3 : 74-102

Exon 4 : 103-124

Exon 5 : 125-143

Exon 7 : 144-185

Exon 9 : 186-274

Exon 10 : 275-305

Exon 11 : 306-332

Exon 12 : 333-370

Exon 13 : 371-441

Highlighted in green : the repeated sequences of the microtubule binding domain.

Annexe 2 – Animal models of Tauopathies

TITLE: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic

REFERENCE: Dujardin S, Colin M & Buée L (2015) Invited review: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**: 59–80

AUTHORS:

Simon Dujardin^{1,2,3}, Morvane Colin^{1,2,3} and Luc Buée^{1,2,3}

¹ Inserm, UMR1172 Jean-Pierre Aubert Research Centre, Lille, France

² Faculté de Médecine, Université de Lille, France

³ Memory Clinic, CHRU, Lille, France

ABSTRACT:

Our aims are to review animal models of tauopathies, which include a number of brain disorders with various aetiologies, including ageing, genetics, infectious diseases, toxins, trauma and other unknown factors. Tauopathies are characterized by the accumulation of filaments of the microtubule-associated tau protein. The different aetiopathogeneses and distinct molecular events involved in tau aggregation have led to the development of various animal models for these diseases.

In this review, rather than listing all current models, we focus on specific animal models addressing, among others, the question of tau hyperphosphorylation, tau aggregation and tau spreading. Physiological conditions, including normal ageing and hibernation, may exhibit tau phosphorylation and some aspects of tauopathies. However, most of the models of tauopathies involve genetically modified animals (mostly rodents, but also fruit fly, zebrafish and worm). Some of these models have been crucial for the development of therapeutic approaches in humans.

The present review shows the difficulty in pinpointing a specific mechanism that may be targeted in tauopathies but also opens up new avenues for innovative therapeutic strategies.

Annexe 3 – Clinical, Neuropathological, and Biochemical Characterization of the Novel Tau Mutation P332S

TITLE: Clinical, Neuropathological, and Biochemical Characterization of the Novel Tau Mutation P332S

REFERENCE: Deramecourt V, Lebert F, Maurage C-A, Fernandez-Gomez F-J, Dujardin S, Colin M, Sergeant N, Buée-Scherrer V, Clot F, Ber IL, Brice A, Pasquier F & Buée L (2012) Clinical, neuropathological, and biochemical characterization of the novel tau mutation P332S. *J. Alzheimers Dis.* **31**: 741–749

AUTHORS:

Vincent Deramecourt^{a,b,c,d}, Florence Lebert^{a,c}, Claude-Alain Maurage^{a,b,d}, Francisco-Jose Fernandez-Gomez^{a,b}, Simon Dujardin^{a,b}, Morvane Colin^{a,b}, Nicolas Sergeant^{a,b}, Valérie Buée-Scherrer^{a,b}, Fabienne Clot^e, Isabelle Le Ber^{f,g,h}, Alexis Brice^{e,f,g,h}, Florence Pasquier^{a,c} and Luc Buée^{a,b,*}

^a*Univ Lille Nord de France, UDSL, Lille, France*

^b*INSERM U837, JPARC, Lille, France*

^c*CHU Lille, Memory Clinic, Lille, France*

^d*CHU Lille, Department of Pathology, Lille, France*

^e*Department of Genetics and Cytogenetics, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France*

^f*CR-ICM UMRS975, Paris, France*

^g*INSERM U975, Paris, France*

^h*Department of Neurology, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France*

ABSTRACT:

MAPT mutations cause autosomal dominant frontotemporal lobar degeneration. These diseases are characterized by considerable heterogeneity in their clinical, neuropathological,

Annexe 4 – Principes des tests comportementaux chez le primate

1) Memory 30 :

Ce test, spécifique de la fonction hippocampale, permet de mesurer la capacité des animaux à mémoriser 30 paires d'images différentes et de retenir pour chacune d'entre elles, l'image qui sera récompensée (30 images sur 60 sont récompensés). Les paires d'images ne sont pas conservées d'une session à l'autre afin d'éviter une forme de mémoire associative. Le singe doit identifier les 30 objets récompensés indépendamment de l'objet non-récompensé qui est présenté en même temps et quelque soit sa position (à droite ou à gauche) sur l'écran.

Tous les animaux sont entraînés jusqu'à atteindre un score de 90% de réponses correctes en baseline. Dans la phase test, les performances sont évaluées sur 4 essais consécutifs et exprimées en % de réponses correctes \pm l'erreur standard. Afin de comparer les performances en baseline (PRE) et en test, le % de réponses correctes dans les 4 dernières sessions de travail est pris en compte pour générer les valeurs de la moyenne baseline. Les mêmes paires de photos sont présentées aux singes à tous les time-points.

2) DNMS : Delayed no-matching to sample

Ce test fait appel aux fonctions exécutives et à la mémoire épisodique. Un objet est tout d'abord présenté à l'animal sur l'écran tactile. L'animal doit le toucher pour montrer qu'il l'a vu, après un délai court (2 sec) ou long (30 sec), l'animal se voit présenter à l'écran une paire d'objets dont l'un correspond à l'objet précédemment présenté accompagné d'un nouvel objet, inédit.

Pour réaliser une réponse correcte, l'animal doit toucher l'objet qui ne lui a pas été présenté initialement.

Une série de 40 essais est présentée par session de travail. La fin de la phase d'apprentissage est atteinte lorsque les animaux atteignent un taux de 90% de réponses correctes. La valeur moyenne des performances réalisées au cours des 4 dernières sessions de travail (dont celle ayant permis à l'animal d'atteindre le critère 90%) est alors prise comme référence baseline (PRE).

Dans la phase test, les performances sont évaluées sur 4 essais consécutifs et exprimées en % de réponses correctes \pm l'erreur standard. Les mêmes objets sont présentés aux singes à tous les timepoints.

3) VDT : Visual Discrimination Task

Ce test est un test non-spécifique des fonctions mnésiques qui mesure la capacité des singes à performer une tâche basique sur écran tactile, démontre que le degré d'attention et de motivation des animaux ainsi que leur capacité à réaliser un test sur écran tactile reste intacts tout au long d'une l'étude, et ce pour les trois groupes d'animaux.

Ce test éprouve la capacité des animaux à discriminer trois objets de forme et couleur différentes et à repérer l'objet gagnant. Trois images de couleur et de forme différentes sont présentées à l'animal à chaque essai, mais une seule de ces images est récompensée.

Dans la phase d'apprentissage, tous les singes sont entraînés jusqu'à atteindre un score de 100% de réponses correctes. Dans la phase test, les performances sont évaluées sur 4 essais consécutifs et exprimés en % de réponses correctes \pm l'erreur standard. Afin de comparer les performances en baseline (PRE) et en test, le % de réponses correctes dans les 4 dernières sessions de travail est pris en compte pour générer les valeurs de la moyenne baseline.