

Université de Lille
Université de Lille 2 Droit et Santé

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

Vincent HUIN

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II

Spécialité : Neurosciences

Epigénomique du gène *MAPT* dans les tauopathies

Soutenue publiquement le 15 Décembre 2016 devant le jury composé de :

M. le Pr. David DEVOS

Examineur

M. le Pr. Jean-Louis GUEANT

Rapporteur

Mme le Dr. Magalie LECOURTOIS

Rapporteur

M. le Pr. Bernard SABLONNIERE

Directeur de Thèse

A ma famille,

à mes amis,

à tous mes proches,

qui m'ont toujours soutenu

et sans qui je n'en serais pas là.

A Lucie,

Tu es ma source de courage face à l'adversité depuis tant d'années. Nous avons franchi ensemble tant d'obstacles que nous ne saurions les compter. Je te serais éternellement reconnaissant pour ton soutien.

Tu es les bonheurs de mes jours et les rêves de mes nuits. Jamais je ne saurai te dire combien je t'aime et combien cette seule pensée me rend heureux.

Chaque jour que je passe à tes côtés est le plus beau jour de ma vie.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury, le **Pr David Devos**, le **Pr Jean-Louis Guéant**, le **Dr Magalie Lecourtois**, le **Dr Claire-Marie Dhaenens** et le **Pr Bernard Sablonnière**, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'appartenir à ce jury de thèse. Je tiens en particulier à remercier le **Pr Jean-Louis Guéant** et le **Dr Magalie Lecourtois** pour avoir gentiment accepté le rôle de rapporteur de thèse, d'avoir lu avec minutie ce manuscrit et d'avoir évalué mon travail.

Je tiens ensuite à remercier le **Dr Luc Buée** pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » pendant mon Master 2, puis cette thèse d'université. J'ai particulièrement apprécié votre constante disponibilité dont j'ai profité sans vergogne malgré l'importance de vos tâches. Mais surtout, j'ai aimé travailler dans votre laboratoire grâce à la bonne humeur et à l'ambiance légère que vous savez insuffler autour de vous.

Je tiens à remercier le **Pr Bernard Sablonnière** qui a été mon directeur de thèse. Vous avez su être là pour moi quand que j'en avais besoin, lors des bons moments comme des mauvais, mes moments d'espoir et de tristesse. J'ai apprécié votre enseignement et votre encadrement. J'espère avoir un jour la capacité de guider et d'inculquer aux autres autant de connaissances et avec autant de pédagogie. Je vous suis particulièrement reconnaissant pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée.

C'est avec une pensée émue que je remercie le **Dr Claire-Marie Dhaenens** qui a été ma co-directrice de thèse. J'ai aimé nos débats scientifiques, tes réflexions constructives qui m'ont beaucoup aidé au quotidien. Ton calme et ta sympathie m'ont toujours guidé dans la bonne direction lors des moments de doute. Même si il était parfois différent du mien, ton avis a toujours compté pour moi. J'ai pu et encore maintenant j'apprends à tes côtés. J'ai réellement pris plaisir à travailler avec toi, en tant qu'étudiant mais aussi en tant qu'ami et j'espère ardemment pouvoir poursuivre nos travaux de recherche ensemble par la suite.

Je remercie le **Dr Susanna Schraen** qui a toujours prêté une oreille attentive à mes travaux et qui a toujours été d'excellent conseil. J'ai pu constater au cours de ces années ton grand professionnalisme, ta force de caractère et ton indéfectible bonne humeur, mais surtout j'ai pu apprécier ton humanité chaleureuse.

Je remercie le **Pr Thierry Brousseau** pour la confiance qu'il a placée en moi. Je le remercie pour toute sa sympathie et l'humanité qu'il a eues à mon égard lors des moments difficiles.

Je remercie le **Dr Marie-Pierre Buisine** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et pour ses conseils avisés.

Je voudrais également remercier l'ensemble de nos collaborateurs qui m'ont permis de donner une ampleur plus importante à ma thèse. Je souhaite remercier le **Dr Enicko Kovari** et le **Pr Charles Duykaerts** ainsi que les personnes travaillant aux neurobanques de Lille, Paris et Genève. Je remercie le **Dr Dominique Caparros-Lefebvre** la nouvelle Erin Brockovich!

Je remercie **les patients** qui ont eus la générosité de faire don de leur cerveau à la science et ont ainsi permis la réalisation de travail de recherche. Je garde également une pensée émue pour **leurs familles**.

Je tiens donc à remercier l'ensemble des chercheurs de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » qui ont toujours été une oreille attentive à mes travaux et d'excellent conseil. Merci aux docteurs **David Blum, Malika Hamdane, Bruno Lefebvre, Nicolas Sergeant, Sandrine Humez, Valérie Vingtdoux, Valérie Buée-Scherrer** et **Marie-Christine Galas**. Je pense également à **Marie-Laure Caillet-Boudin** qui je l'espère profite bien de sa retraite.

Un grand merci et surtout bien du courage pour la suite pour tous mes co-thésards, **Alban, Anthony, Meryem, Coline, Marie, Clément, Delphine, Manon, Caroline, Mélissa, Claudia** ainsi qu'aux post-docs du labo, **Emilie, Claire, Lucrezia, Maryline, Catherine** et **Davina**. Je remercie aussi **Mathieu** pour sa bonne humeur et ses conseils avisés en techniques comme en musique.

J'ai aussi une pensée pour **Mégane Homa**, qui débute sa thèse avec nous ! Je lui souhaite bonne chance et bon courage !

Merci beaucoup à **Sabiha, Séverine, Raphaëlle, Seb, Domi, Hélène, Charlotte, Vanessa, Marie-Line** et **Alexandre** pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

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

Durant ces quatre années de thèse d'université, l'hôpital a consisté en la moitié de mon temps. Cela m'a demandé beaucoup d'efforts et été récompensé par une reconnaissance particulière. Lors de ces quatre années j'ai néanmoins pu apprécier de nombreuses personnes pour leurs personnalités et leurs compétences. Je remercie donc **Isabelle, Nathalie, Adrien, Amélie, Christiane, Alexandre, Kathy, Patrick, Luc** et **Michel**.

Je remercie mes amis, **Stéphane**, **Yann** et **Armelle** pour leur soutien, leur présence et pour m'avoir fait rire chaque fois que cela était nécessaire.

Enfin, il m'est très difficile de remercier à leur juste valeur et sans oublier personne toutes les personnes qui m'ont aidé durant cette thèse d'université. Merci donc à toutes les personnes qui ont contribué à ce que je puisse aujourd'hui présenter cette thèse.

Résumé

Les tauopathies sont des maladies neurodégénératives caractérisées par l'agrégation intracérébrale de protéines tau anormales. Cependant ces maladies sont très hétérogènes sur le plan clinique, anatomopathologique mais aussi biochimique avec l'agrégation de différentes isoformes de protéines tau. De nombreux axes de recherche existent à ce jour afin de mieux comprendre ces maladies incurables. Au cours de cette thèse d'université, nous avons étudié les modifications de l'épigénome qui constituent une piste nouvelle et très prometteuse dans la recherche sur les maladies neurodégénératives. L'épigénétique est un processus dynamique et réversible qui peut être modifié par de nombreux facteurs génétiques ou environnementaux et qui joue un rôle très important dans la régulation des gènes. De nombreuses études rapportent une association entre certaines marques épigénétiques et les maladies neurodégénératives. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, il a été observé une hyperméthylation de l'ADN, au niveau du promoteur du gène *MAPT* qui code les protéines tau.

Dans ce contexte, nos objectifs étaient de déterminer si des variations de l'épigénome impliquant le gène *MAPT* contribuent à l'expression différentielle des protéines tau qui est observée dans les différentes classes de tauopathies. Nous avons donc constitué et caractérisé une banque de prélèvements cérébraux de témoins et de patients atteints de différentes tauopathies. Puis nous avons analysé la méthylation de l'ADN dans 3 tauopathies : la maladie d'Alzheimer, la paralysie supranucléaire progressive et la DCB. Notre étude a permis de mettre en évidence chez les patients atteints de PSP une hypométhylation dans l'intron 0 du gène *MAPT*. Cette hypométhylation ne concernait que le cortex frontal, affecté par la pathologie tau, mais pas le cortex occipital qui est épargné par la pathologie tau. De plus, nous avons également mis en évidence dans le tissu cérébral des patients atteints de PSP une hyperexpression des ARNm de *MAPT* par rapport aux témoins. Nous démontrons avec ce travail que l'hypométhylation de l'ADN de l'intron 0 de *MAPT* constitue une signature épigénétique spécifique de la PSP. Cette première étude nous a conduits à suspecter l'existence d'un promoteur alternatif du gène *MAPT* situé dans cette région de l'intron 0. Nous avons donc testé *in vitro* l'activité de ce promoteur et cloné des transcrits issu de ce promoteur alternatif. Nous avons ensuite confirmé ces analyses par la mesure de l'expression des ARNm par qPCR. Au total, ces expériences prouvent l'existence et la fonctionnalité de ce promoteur alternatif dans le cerveau humain. De plus, l'activation de ce promoteur alternatif aboutit à la transcription d'ARNm plus courts codant pour de nouvelles protéines tau qui pourraient être impliquées dans la survenue des tauopathies.

Abstract

Tauopathies are neurodegenerative diseases characterized by intracerebral aggregation of abnormal tau proteins. However, these diseases are heterogeneous clinically, pathologically but also biochemically with the aggregation of different isoforms of tau protein. Many lines of research exist to date to better understand these incurable diseases. During this university thesis, we studied the changes in the epigenome that constitute a new and very promising approach in research on neurodegenerative diseases. Epigenetics is a dynamic and reversible process which can be modified by numerous genetic or environmental factors and plays a very important role in gene regulation. Many studies report an association between some epigenetic marks and neurodegenerative diseases. For example, in Alzheimer's disease, it has been observed hypermethylation of DNA in the promoter of the *MAPT* gene which encodes the tau protein.

In this context, our objective was to determine if changes in epigenomic involving *MAPT* gene contribute to the differential expression of tau protein which is observed in the different classes of tauopathies. So we have established and characterized a human brainbank of controls and patients with different tauopathies. Then we analyzed the DNA methylation in 3 tauopathies: Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, and CBD. Our study highlighted in PSP patients a hypomethylation in intron 0 of *MAPT* gene. This hypomethylation concerned only the frontal cortex, affected by the tau-pathology but not the occipital cortex which is spared by tau-pathology. In addition, we also shown in the brain tissue of patients with PSP an overexpression of mRNA of *MAPT* compared to controls. We demonstrate in this work that hypomethylation of DNA in intron 0 of *MAPT* is a specific epigenetic signature of PSP. This first study has led us to suspect the existence of an alternative promoter of the *MAPT* gene located in this region of intron 0. We tested the *in vitro* activity of this promoter and cloned transcripts derived from this alternative promoter. We then confirmed this analysis by measuring mRNA expression by qPCR. In total, these experiments prove the existence and the functionality of this alternative promoter in the human brain. Furthermore, activation of the alternative promoter results in shorter mRNA transcripts encoding novel tau proteins that might be involved in the onset of the tauopathies.

Sommaire

Sommaire

Sommaire.....	3
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations	11
Introduction.....	13
Chapitre 1 : Les tauopathies.....	14
Généralités sur les maladies neurodégénératives	14
Les tauopathies : des maladies très hétérogènes.....	16
Tauopathies primaires, secondaires et autres	17
Présentation clinique.....	19
Examen neuropathologique	21
Examen biochimique.....	23
Une prise en charge médicale insatisfaisante.....	25
Chapitre 2 : Les quatre tauopathies étudiées	27
La maladie d'Alzheimer	27
Généralités.....	27
Clinique.....	28
Examens paracliniques.....	28
Examens neuropathologique et biochimique	29
Une MA ou plusieurs MA?.....	31
La paralysie supranucléaire progressive	33
Généralités.....	33
Clinique.....	34
Examens paracliniques.....	35
Examens neuropathologique et biochimique	35
La dégénérescence cortico-basale.....	37
Généralités.....	37
Clinique.....	37
Examens paracliniques.....	38
Examens neuropathologique et biochimique	38

La maladie de Pick	39
Généralités.....	39
Clinique.....	39
Examens paracliniques.....	40
Examens neuropathologique et biochimique	40
Chapitre 3 : Du gène <i>MAPT</i> aux protéines tau	43
Le gène <i>MAPT</i>	43
Généralités.....	43
Expression	45
Epissage alternatif	48
Exons alternatifs 4a et 8	48
Exons alternatifs 2, 3, 6 et 10	48
Structure des protéines tau	51
Régions et domaines protéiques.....	51
Structures primaire et secondaire des protéines tau cérébrales.....	52
Les fonctions des protéines tau.....	54
Généralités.....	54
Régulation de la stabilité des microtubules	55
Transport axonal.....	55
Plasticité synaptique.....	56
Fonctions nucléaires des protéines tau.....	57
Autres fonctions des protéines tau.....	57
Chapitre 4 : Physiopathologie des tauopathies.....	59
Les facteurs de risques génétiques	59
Etiologies génétiques des tauopathies.....	59
Facteurs de susceptibilité génétique	62
<i>MAPT</i>	62
<i>APOE</i>	65
Autres facteurs génétiques de susceptibilité aux tauopathies.....	65
Facteurs environnementaux impliqués dans les tauopathies.....	67
Environnement et MA.....	68
Environnement et PSP.....	69
Interaction entre génétique et environnement.....	70
Régulation de l'expression des gènes par les promoteurs alternatifs	71

Mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les promoteurs alternatifs.	71
Régulation de l'expression	71
Diversité des séquences non codantes	71
Diversité des séquences codantes	72
Régulation de l'épissage alternatif	72
Promoteurs alternatifs de <i>MAPT</i>	74
Régulation de l'expression des gènes par les modifications épigénomiques	76
Définition	76
Méthylation de l'ADN	76
Méthylation de l'ADN et cerveau	78
Méthylation de l'ADN et génétique	79
Méthylation de l'ADN et âge	80
Méthylation de l'ADN et environnement	80
Lien entre méthylation de l'ADN et MA	81
Objectifs	83
Résultats	86
Chapitre 1 : Constitution et caractérisation d'une banque de prélèvements cérébraux humain	87
I- Introduction	87
II- Méthodes	88
III- Résultats	90
IV- Résultats complémentaires	91
Chapitre 2 : La méthylation de l'ADN du gène <i>MAPT</i> : une signature des tauopathies	109
I- Introduction	109
Contexte de l'étude	109
Objectif de l'étude	110
Résultats	110
II- Résultats préliminaires	111
Choix des régions d'intérêt	111
Analyse préliminaire par PCR-séquençage Sanger après traitement au bisulfite	114
Pyroséquençage de l'exon 10 de <i>MAPT</i>	114
III- Article 2 : <i>The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain</i>	116
IV- Résultats complémentaires	140
Hypométhylation et facteurs de confusion	140

Chapitre 3 : Promoteur alternatif de <i>MAPT</i>	142
I- Introduction.....	142
Contexte de l'étude.....	142
Objectif de l'étude	143
Résultats	143
II- Résultats complémentaires : Etude d'un promoteur alternatif du gène <i>MAPT</i> dans les tauopathies	145
Analyse bioinformatique	145
Test de l'activité des promoteurs.....	145
Clonage des promoteurs A et B de <i>MAPT</i>	145
Activité luciférase des promoteurs	146
Altération de l'expression dans le cerveau humain	147
Matériels et méthodes.....	147
Confirmation de l'altération des différents promoteurs de <i>MAPT</i> dans le tissu cérébral.....	148
ANOVA patients Alzheimer	150
Altération de l'épissage alternatif selon les promoteurs alternatifs	150
Mise en évidence des transcrits alternatifs dans le cerveau humain par 5'RACE	152
Matériels et méthodes.....	152
Résultats de 5'RACE.....	153
Discussion.....	157
Constitution de la base d'échantillons	158
Cluster de PSP dans le Nord de la France.....	158
Hypométhylation du gène <i>MAPT</i> dans la PSP	161
Analyses de méthylation.....	161
Interprétation de l'hypométhylation de CpG1 ?.....	162
Hypothèses et perspectives	167
Promoteur alternatif du gène <i>MAPT</i>	170
Analyse bioinformatique	170
Analyses par qPCR	170
Analyses par 5'RACE.....	171
Hypothèse.....	172
Perspectives	172
Conclusion	173
Bibliographie.....	174

Annexes	207
ANNEXE 1 : Base de prélèvements cérébraux humain	208
ANNEXE 2 : Exemple de séquençage Sanger après bisulfite	212
ANNEXE 3 : Exemple de pyroséquence.....	213

Liste des figures

Figure 1 : La classification biochimique des tauopathies.....	24
Figure 2 : Les causes de démence en France.....	27
Figure 3 : Classification de Thal.....	30
Figure 4 : Stades de Braak.....	31
Figure 5 : Répartition de la pathologie tau selon les formes de PSP.....	36
Figure 6 : Lésions histologiques astrocytaires de la PSP et de la DCB.....	38
Figure 7 : Corps de Pick.....	41
Figure 8 : Les gènes du locus de <i>MAPT</i>	44
Figure 9 : Expression des ARNm de <i>MAPT</i> dans les tissus humains.....	46
Figure 10 : Expression des protéines tau dans les tissus humains.....	47
Figure 11 : Représentation schématique du gène <i>MAPT</i> et des différents produits du gène exprimés dans le cerveau humain adulte.....	50
Figure 12 : Conformation native de l'isoforme 2N4R.....	53
Figure 13 : Différentes fonctions des protéines tau dans les neurones.....	58
Figure 14 : Hypothèse de la cascade amyloïde.....	61
Figure 15 : Répartition des mutations de <i>MAPT</i> dans les FTDP-17.....	62
Figure 16 : Haplotypes du locus <i>MAPT</i>	64
Figure 17 : Variations génétiques et facteurs de susceptibilité aux tauopathies.....	67
Figure 18 : Différents facteurs de risques environnementaux de la MA.....	69
Figure 19 : Différents types de promoteurs alternatifs et leurs conséquences.....	73
Figure 20 : Les transcrits de <i>MAPT</i>	74
Figure 21 : Méthylation de l'ADN et transcription.....	77
Figure 22 : Méthylation de l'ADN et promoteurs alternatifs.....	78
Figure 23 : Cycle de méthylation/déméthylation de l'homocystéine.....	81
Figure 24 : Régions cérébrales étudiées.....	89
Figure 25 (Article 1, Figure 1) : Places of residence of the 92 patients at the time of PSP onset.....	98
Figure 26 : Analyse <i>in silico</i> des régions d'intérêt du gène <i>MAPT</i>	113
Figure 27 : Localisation des pyroséquences de l'exon 10.....	115
Figure 28 (Article 2, Figure 1) : Schematic diagram of <i>MAPT</i> and the position of the different CpG tested in the candidate region.....	122

Figure 29 (Article 2, Figure 2) : Comparison of <i>MAPT</i> CpG1 methylation levels in the frontal area (A) and in the occipital area (B) between tauopathies and controls.	123
Figure 30 (Article 2, Figure 3) : Replication analysis.	124
Figure 31 (Article 2, Figure 4) : <i>MAPT</i> expression in post-mortem brain based on the frontal area (A) and the occipital area (B) from the studied groups.	124
Figure 32 (Article 2, Supplemental Figure S1) : Timeline of analyses on post-mortem brains.	131
Figure 33 (Article 2, Supplemental Figure S2) : Plots of the Pearson correlations of the methylation levels of the five CpGs tested.	131
Figure 34 (Article 2, Supplemental Figure S3) : Comparison of <i>MAPT</i> methylation levels in the frontal area (A) and in the occipital area (B) between tauopathies and controls.	132
Figure 35 (Article 2, Supplemental Figure S4) : CpG1 methylation levels and <i>MAPT</i> mRNA expression.	133
Figure 36 : Méthylation de CpG1 et facteurs de confusion.	141
Figure 37 : Mesure de l'expression des ARNm de <i>MAPT</i> par qRT-PCR.	149
Figure 38 : Corrélacion entre l'expression des ARNm de <i>MAPT</i> issus des différents promoteurs et les ARNm de <i>MAPT</i> avec exon 10.	151
Figure 39 : Analyse par 5'RACE-PCR des ARNm de <i>MAPT</i> dans le cerveau humain.	154
Figure 40 : Les séquences d'acides aminés des protéines tau sauvages et courtes.	156
Figure 41 : Hypothèse épigénétique de la PSP.	169
Figure 42 : Electrophorégramme après traitement au bisulfite de l'intron 9 de <i>MAPT</i>	212
Figure 43 : Pyroséquence de l'intron 10 de <i>MAPT</i>	213

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des maladies neurodégénératives : Pathologies et protéines.	15
Tableau 2 : Les différentes tauopathies.....	16
Tableau 3 : Tauopathies primaires, secondaires et en lien avec d'autres pathologies.....	18
Tableau 4 : Caractéristiques à l'examen neuropathologique des principales tauopathies.	22
Tableau 5 : Les étiologies génétiques des tauopathies.	60
Tableau 6 (Article 1, Tableau 1) : Anatomical pathologic findings in the 13 autopsied cases from the Wattlelos/Leers PSP cluster.	102
Tableau 7 (Article 2, Table 1) : Main characteristics of the post-mortem cases analyzed in this study.....	125
Tableau 8 (Article 2, Supplemental S1) : List of primers.	133
Tableau 9 : Base de prélèvements cérébraux humains de tauopathies.....	211

Liste des abréviations

A β : Peptide β -amyloïde

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

APOE : Apolipoprotéine E

APP : *Amyloid precursor protein*

CGI : *CpG Island*

DCB : Dégénérescence cortico-basale

DGA : Démence à grains agyrophiles

DLFT : Dégénérescence lobaire fronto-temporale

DMPK : *Dystrophia myotonica protein kinase*

DNF : Dégénérescence neurofibrillaire

DNMT : DNA methyl-transferase

ETC : Encéphalopathie traumatique chronique

EWAS : *Epigenome-wide association study*

FTDP-17 : *Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*

GPe : Globus pallidus externe

GPI : Globus pallidus interne

GWAS : *Genome-wide association study*

IRM : Imagerie par résonance magnétique

kDa : Kilodalton

kg : Kilogramme

LCS : Liquide cérébro-spinal

LTP : *Long-term potentiation*

MA : Maladie d'Alzheimer

MAPT : *Microtubule Associated Protein Tau*

MBD : *Methyl-CpG-binding domain*

MCI : *Mild Cognitive Impairment*

NGS : *Next-generation sequencing*

NFT : *Neurofibrillary tangle*

ORF : *Open Reading Frame*

PHF : *Paired Helical Filaments*

PiD : *Pick's disease*

PSEN1 : *Presenilin-1*

PSEN2 : *Presenilin-2*

PSP : Paralyse supranucléaire progressive

RIN : *RNA integrity number*

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SNC : Système nerveux central

SNP : *Single-nucleotide polymorphism*

STN : Noyau subthalamique

TDP43 : *TAR DNA-binding protein 43*

TEP : Tomographie à émission de positon

UTR : *Untranslated region*

Introduction

Chapitre 1 : Les tauopathies

Généralités sur les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont des maladies invalidantes aboutissant au dysfonctionnement et à la dégénérescence des neurones. Elles sont responsables de l'apparition de troubles neurologiques variés et bien souvent irréversibles comme une altération des fonctions cognitives conduisant fréquemment à une démence, des troubles du comportement ou encore différents déficits sensitifs et/ou moteurs. Pour la plupart, ces maladies évoluent lentement et inexorablement vers une dégradation se traduisant par un handicap, une perte d'autonomie puis au décès des patients que ce soit directement lié à l'évolution de la maladie ou lié à ses complications.

Les progrès réalisés dans les méthodes d'immunohistochimie ont permis de comprendre que beaucoup de ces maladies pourtant très différentes présentent des similitudes (Taylor *et al.*, 2002; Ross & Poirier, 2004). En effet, au niveau cellulaire la plupart d'entre elles se caractérisent par l'accumulation de protéines anormales. Au niveau moléculaire, une ou plusieurs protéines natives acquièrent une conformation anormale riche en feuillets plissés β l'amenant à se lier à elle-même, à s'agréger dans le système nerveux formant des dépôts protéiques fibrillaires. La nature toxique ou protectrice de ces agrégats n'est pas toujours bien définie, cependant ces découvertes ont dirigé la recherche médicale vers l'étude des causes et des mécanismes de ces agrégations protéiques.

Les maladies neurodégénératives peuvent désormais être classées selon le type de protéines anormales détectées (Tableau 1) (Ross & Poirier, 2004; Kovacs, 2016). Par exemple, on distingue les maladies associées à des dépôts de peptides β -amyloïde, de protéines tau, d' α -synucléine, de TDP43 ou encore de protéines avec des motifs polyglutamine. Parmi les maladies neurodégénératives avec agrégation d' α -synucléine, nous pouvons citer la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée avec la formation au niveau histologique de dépôts fibrillaires à type de corps de Lewy. Les tauopathies sont caractérisées par la présence dans le cerveau des patients d'agrégats intracellulaires de protéines tau anormales.

Groupe de maladie	Protéine	Type de maladie	Phénotype dominant
Amyloïdopathies	A β	Angiopathie amyloïde cérébrale	DEM
Tauopathies secondaires	Tau, A β	Maladie d'Alzheimer	DEM
		Démence liée à la trisomie 21	DEM
	Tau, Abri	Démence familiale de type britannique	DEM
	Tau, Adan	Démence familiale de type danois	DEM
Tauopathies primaires	Tau	Démence à grains agyrophiles	DEM
		Paralysie supranucléaire progressive	DLFT/Mouv
		Dégénérescence corticobasale	DLFT/Mouv
		Maladie Pick	DLFT
		FTDP-17	DLFT
α -Synucléinopathies	α -Synucléine	Maladie de Parkinson	Mouv
		Démence à corps de Lewy	DEM/Mouv
		Atrophie multisystématisée	Mouv
Protéinopathies TDP-43	TDP-43	DLFT liée à TDP-43 (type A-D)	DLFT
		DLFT + Sclérose latérale amyotrophique	DLFT/Mouv
		Sclérose latérale amyotrophique	Mouv
Protéinopathies FUS	FUS	DLFT liée à FUS	DLFT
		DLFT + Sclérose latérale amyotrophique	DLFT/Mouv
		Sclérose latérale amyotrophique	Mouv
Maladies à Prion	PrP	Maladie de Creutzfeldt-Jakob	DEM/Mouv
		Kuru	DEM/Mouv
		Insomnie fatale	DEM/Mouv
Maladie par expansion de polyglutamine	<i>variable</i>	Maladie de Huntington	DEM/Mouv
		SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17	Mouv
		Maladie de Kennedy	Mouv
		DRPLA	DEM/Mouv
		Ferritine	Ferritinopathie héréditaire
Autres protéinopathies	Gelsoline	amyloïdose héréditaire avec atteinte cérébrale	DEM
	Cystatine		
	Transthyrétine		
	UPS		

Tableau 1 : Classification des maladies neurodégénératives : Pathologies et protéines.

Abréviations : DEM : syndrome démentiel; DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale; Mouv : anomalies de mouvement. D'après (Kovacs, 2016).

Les tauopathies : des maladies très hétérogènes

Le terme tauopathies regroupe des maladies très variées avec des présentations cliniques, des aspects histologiques et des étiologies différentes. Néanmoins, elles ont en commun de concerner surtout les personnes âgées de plus de 65 ans et d'aboutir à un déclin cognitif puis à une démence. Ces maladies évoluent souvent lentement et de manière progressive. La classification des tauopathies comprend ainsi 25 maladies distinctes (Tableau 2) (pour revue : (Spillantini & Goedert, 2013)). Nous tenterons par la suite de définir les similitudes et les grandes différences entre ces maladies.

Dégénérescence Corticobasale
Dégénérescences neurofibrillaires diffuses avec calcification
Démence à grains argyrophiles
Démence familiale de type danois
Démence familiale type britannique
Démence frontotemporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17
Démence liée à la trisomie 21
DLFT (certaines formes causées par des mutations de <i>C9orf72</i>)
Dystrophie myotonique
Encéphalopathie traumatique chronique ou démence pugilistique
Gliose sous-corticale progressive familiale
Maladie à Prion avec accumulations neurofibrillaires (mutations p.Phe198Ser et p.Gln217Arg de <i>PNRP</i>)
Maladie d'Alzheimer
Maladie de Niemann-Pick de type C
Maladie de Pick
Neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer
Panencéphalite sclérosante subaigüe
Paralyse supra-nucléaire progressive
Parkinsonisme de Guadeloupe
Retard mental associé à <i>SLC9A6</i>
Sclérose latérale amyotrophique avec pathologie neurofibrillaire, non-Guam
Syndrome de l'île de Guam (Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex)
Syndrome Parkinsonien post-encéphalitique
Tauopathie de la substance blanche avec inclusions gliales globulaires
Tauopathie primaire liée au vieillissement

Tableau 2 : Les différentes tauopathies.

D'après (Spillantini & Goedert, 2013).

Tauopathies primaires, secondaires et autres

Il est possible de réaliser une première distinction dans les tauopathies selon le type de lésion histologique majoritaire et la nature des protéines anormales agrégées (Tableau 3). Les tauopathies avec une prédominance de la pathologie tau sont appelées tauopathies primaires et correspondent notamment aux FTDP-17, à la PSP, à la DCB, à la maladie de Pick et à la démence à grains agyrophiles. Elles doivent être différenciées des tauopathies secondaires où l'agrégation de tau est associée à des dépôts amyloïdes. C'est notamment le cas de la MA et de la démence liée à la trisomie 21. Dans les tauopathies secondaires, l'agrégation ne constitue pas l'unique stigmate pathogénique observable et il existe un débat aujourd'hui afin de déterminer si l'accumulation de protéines tau dans ces maladies et particulièrement dans la MA, est un événement initiateur de la maladie ou plutôt une conséquence de la pathologie amyloïde et donc si elle constitue ou non une cible thérapeutique potentielle pour ces maladies. Enfin, il convient également de mettre à part certaines tauopathies où une agrégation cérébrale des protéines tau est observée mais qui est la conséquence d'une autre maladie. Dans ces pathologies, tau est une des cibles de la mutation princeps et l'agrégation intracérébrale participe peu au phénotype, en constituant un épiphénomène. C'est le cas de la dystrophie myotonique de type I ou maladie de Steinert, qui est une maladie génétique à expansions de triplets. Dans cette maladie, l'expression de transcrite du gène *DMPK* présentant un gain de fonction toxique aboutit à l'altération de l'épissage alternatif de nombreux ARNm dont ceux de *MAPT*, le gène codant les protéines tau. Cependant, l'agrégation cérébrale de tau joue un rôle mineur dans le phénotype des patients chez lesquels est surtout observé un déficit musculaire associé à des troubles du rythme et/ou de conduction cardiaque.

Tauopathies primaires

Dégénérescence Corticobasale
Dégénérescences neurofibrillaires diffuses avec calcification
Démence à grains argyrophiles
Démence frontotemporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17
Giose sous-corticale progressive familiale
Maladie de Pick
Paralyse supra-nucléaire progressive
Parkinsonisme de Guadeloupe
Sclérose latérale amyotrophique avec pathologie neurofibrillaire, non-Guam
Syndrome de l'île de Guam (Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex)
Syndrome Parkinsonien post-encéphalitique
Tauopathie de la substance blanche avec inclusions gliales globulaires
Tauopathie primaire liée au vieillissement

Tauopathies secondaires, associées à d'autres dépôts protéiques

Démence familiale de type danois
Démence familiale type britannique
Démence liées à la trisomie 21
Encéphalopathie traumatique chronique ou démence pugilistique
Maladie d'Alzheimer

Tauopathies en lien avec d'autres pathologies

DLFT (certaines formes causées par des mutations de *C9orf72*)
Dystrophie myotonique
Maladie à Prion avec accumulations neurofibrillaires
Maladie de Niemann-Pick de type C
Neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer
Panencéphalite sclérosante subaigüe
Retard mental associé à *SLC9A6*

Tableau 3 : Tauopathies primaires, secondaires et en lien avec d'autres pathologies.

Présentation clinique

L'aspect clinique dépend donc directement de la distribution topographique des lésions et les malades présentent des signes cliniques évocateurs de l'atteinte d'une structure cérébrale caractéristique d'une maladie ou d'un groupe de maladie. Par exemple, l'existence d'une ophtalmoplégie précoce associée à des chutes évoque le diagnostic de PSP, alors que les patients atteints de DCB présentent une démence associée à d'autres signes plus spécifiques comme une apraxie asymétrique et des troubles sensitifs. Bien souvent, les tableaux cliniques n'offrent qu'une orientation et ne suffisent pas à poser un diagnostic de certitude. Ces tableaux cliniques peuvent d'ailleurs être expliqués par de nombreuses étiologies différentes des tauopathies. Grossièrement, il est possible de distinguer les tauopathies selon quatre grands tableaux cliniques : (i) les démences de type Alzheimer avec la MA ainsi que des démences présentant une atteinte cognitive similaire; (ii) les dégénérescences fronto-temporales; (iii) les démences sous-corticales et cortico-sous-corticales; (iv) et les syndromes parkinsonien atypiques.

Les démences de type Alzheimer sont caractérisées par une atteinte initiale de la mémoire épisodique et de travail qui s'accompagnera avec l'évolution de la maladie, d'une atteinte de la mémoire à long terme, de troubles des fonctions exécutives, du langage, de la cognition et des praxies. Les tauopathies associées à une démence de type Alzheimer sont bien évidemment la MA qui est également la plus fréquente cause de démence, la démence à grains agyrophiles et la tauopathie primaire liée à l'âge.

Les dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT) sont évoquées devant un tableau clinique de démence où prédomineront des troubles du comportement, de l'humeur et du caractère liés à un syndrome frontal. Les troubles du langage sont également très fréquents dans les DFT. A la différence de la MA et des démences de type Alzheimer, les troubles mnésiques passent au second plan dans ces démences. Les tauopathies associées à une dégénérescence fronto-temporale sont notamment les dégénérescences lobaires fronto-temporales, la maladie de Pick et la plupart des FTDP-17. Les DLFT représentent 10 % des démences et sont de révélation plus précoces que la MA sporadique avec une survenue vers 50-60 ans. La majorité des DLFT ne sont toutefois pas des tauopathies.

Le tableau clinique des démences sous-corticales et cortico-sous-corticales est dominé par les signes psychiatriques (troubles de l'humeur, troubles psychotiques à type d'hallucination ou de sentiment de persécution) et peut faire évoquer notamment une démence liée à la PSP bien que ce diagnostic soit beaucoup moins fréquent que d'autres

maladies neurodégénératives comme la démence à corps de Lewy ou la démence liée à l'évolution d'une maladie de Parkinson.

Les syndromes parkinsoniens atypiques sont caractérisés par une akinésie, une hypertonie et un tremblement, associés à la présence d'autres signes cliniques tels qu'une atteinte pyramidale ou une ophtalmoplégie. Ce diagnostic différentiel avec une maladie de Parkinson est porté grâce à l'imagerie, et le plus souvent à une mauvaise réponse à la L-dopa. Les tauopathies associées à un syndrome parkinsonien atypique sont notamment la PSP, la DCB et le parkinsonisme post-encéphalitique. Les patients atteints par ces maladies ont une atteinte neurologique touchant surtout les fonctions motrices pouvant évoluer pendant des années sans que soit observée une atteinte des fonctions cognitives.

Au cours de l'évolution de ces tauopathies, d'autres régions cérébrales et donc d'autres fonctions peuvent être touchées. Différentes lésions peuvent ainsi affecter les mêmes structures cérébrales. Il en résulte que les maladies neurodégénératives en général et donc les tauopathies en particulier peuvent avoir des présentations cliniques difficiles à différencier, même pour un neurologue chevronné. De plus, il n'est pas rare d'observer différentes causes de démences associées chez un même patient. Par exemple, un patient peut présenter une démence d'origine vasculaire et une maladie d'Alzheimer. Il est également possible d'observer de manière concomitante chez un même individu deux tauopathies comme une MA et une DCB. C'est pourquoi le diagnostic des tauopathies est établi en pratique courante sur la base d'un faisceau de présomptions associant les données cliniques, biologiques et radiologiques. Cependant, le diagnostic de certitude est réalisé post-mortem et repose sur l'examen neuropathologique.

Examen neuropathologique

Lors de cet examen les phénotypes neuropathologiques sont différenciés en fonction des différents types de lésions histologiques observées, de leur morphologie, des types cellulaires et des structures cérébrales affectées, ainsi que de la composition en isoformes de protéine tau agrégées (Tableau 4) (pour revue : (Kovacs, 2015)).

Les protéines tau peuvent par exemple s'accumuler dans les neurones, sous la forme de structures neurofibrillaires enchevêtrées ou « neurofibrillary tangles » (NFT) emplissant tout le compartiment somato-dendritique. Cet aspect d'inclusion intraneuronale de protéines tau anormales porte également en français le nom de dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Il est également possible d'observer particulièrement dans le cas de la maladie de Pick des inclusions cytoplasmiques de protéines tau fibrillaires de formes sphériques et appelées "Corps de Pick". Les astrocytes et oligodendrocytes peuvent également être touchés, particulièrement dans la DCB ou la PSP avec des dépôts astrocytaires de protéines tau insolubles ayant un aspect en touffes, des plaques astrocytaires ou encore des inclusions globulaires astrogliales. Les structures cérébrales atteintes apportent également des indications précieuses comme l'atteinte corticale focale et asymétrique qui caractérise la DCB.

Maladies	Tauopathies primaires						Tauopathies secondaires		
	PSP	DCB	DGA	Pick	FTDP-17	PART	MA	T21	ETC
Distribution topographique	Régions sous-corticales, isocortex frontal et temporal	Régions sous-corticales, isocortex frontal et temporal	Hippocampe, isocortex temporal, hypothalamus	Régions sous-corticales, isocortex frontal et temporal	Régions sous-corticales, isocortex frontal et temporal	Hippocampe et cortex entorhinal	Formation hippocampique plus ensemble de isocortex	Formation hippocampique plus ensemble de isocortex	Isocortex frontal et temporal plus formation hippocampique
Distribution dans les couches de l'isocortex	II et III	II et VI	II et III	II et IV	variable	II et VI	II, III, V et VI	II, III, V et VI	II et III
Biochimie	3R + 4R 4R >> 3R >>	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellules atteintes par la pathologie tau	2	2	2	3	1, 2 ou 3	1	1	1	1
Neurones	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Astrocyles	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
Oligodendrocyles	+	+	+	+	+	+/-			+/-
Cytopathologie									
NFT neuronal diffuse	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Corps de Pick				+	+/-				
Grains agyrophiles					+/-				
Corps bobinés	+	+	+		+/-	+/-			+/-
Astrocyles en touffe	+				+/-				
Plaques astrocytaires		+			+/-	+/-			+/-
Immunohistochimie									
Dépôts de peptide Aβ	*	*	*	*			+	+	+/-
Dépôts de TDP-43									+

Tableau 4 : Caractéristiques à l'examen neuropathologique des principales tauopathies.

Abréviations : DGA = démence à grains agyrophiles, ETC = Encéphalopathie traumatique chronique. D'après (Kovacs, 2015).

Examen biochimique

Un autre élément important de l'examen neuropathologique est l'analyse du contenu en isoforme tau agrégées dans le cerveau, et plus particulièrement des isoformes "3R" et "4R". En effet, différentes isoformes de protéines tau peuvent être générées par l'épissage des exons alternatifs des transcrits du gène *MAPT*. Parmi ces isoformes, celles incluant l'exon 10 possèdent 4 domaines protéiques répétés de liaison aux microtubules et sont dénommées « isoformes 4R ». Celles excluant l'exon 10 et possédant 3 domaines répétés sont dénommées « isoformes 3R ». Dans le cerveau humain normal, des quantités similaires d'isoformes 3R et 4R sont observées. Chacune de ces isoformes peut être agrégée dans le cerveau des patients atteints de tauopathies, mais il est possible de distinguer différents groupes de tauopathies selon la nature des isoformes 3R ou 4R présentes dans les agrégats. La composition en isoformes de protéines tau agrégées permet de classer les tauopathies selon 4 classes. La classe I correspond à la MA, la démence liée à la trisomie 21, la démence pugilistique, ou encore la maladie de Niemann-Pick de type C. Cette classe I se caractérise au niveau moléculaire par l'agrégation des isoformes 3R et 4R de Tau. Dans la classe II, ce sont surtout les isoformes 4R qui sont agrégées. Les tauopathies appartenant à cette classe II sont la PSP, la DCB et la démence à grains agyrophiles. La classe III est caractérisée par l'agrégation de formes 3R et correspond à la maladie de Pick. Dans cette classification, les FTDP-17 sont une exception car elles peuvent appartenir aux 3 premières classes de tauopathies. Enfin, il est possible d'observer dans le cerveau de patient atteints de dystrophie myotonique de type I et II, une agrégation d'isoformes de petites tailles de protéines tau insolubles n'incluant ni l'exon 10, ni les exons 2 et 3. Ces deux maladies constituent la classe IV. A noter que le diagnostic de cette dernière classe n'est pas réalisé en pratique courante car le diagnostic de dystrophie myotonique est évoqué devant la clinique et confirmé par l'électromyographie et la biologie moléculaire (Figure 1) (pour revues : (Buée *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2008)).

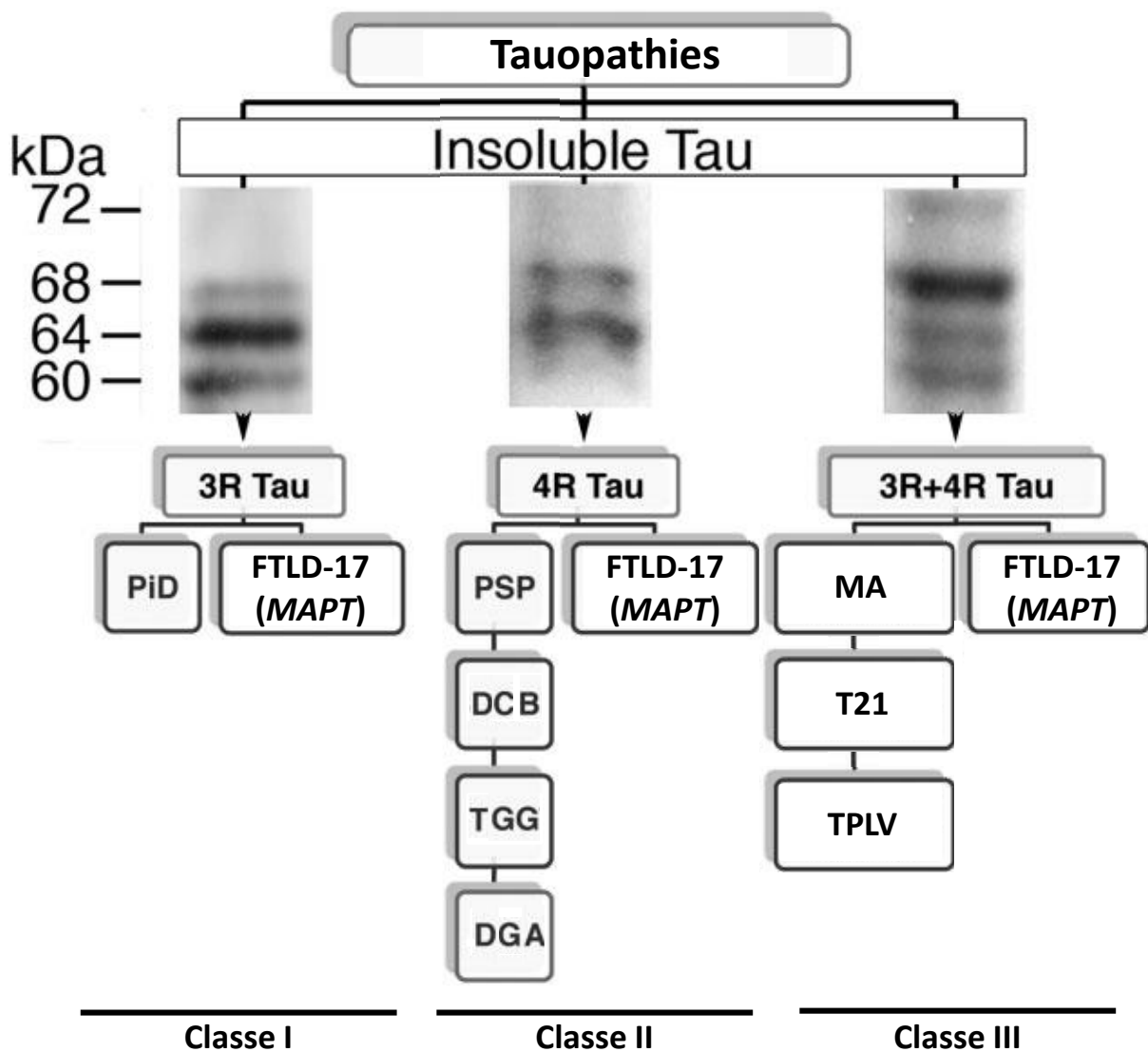


Figure 1 : La classification biochimique des tauopathies.

Les principales tauopathies sont classées selon les différents profils de protéines tau agrégées observées par Western-blot. Les FTLD-17 font figure d'exception car elles peuvent appartenir aux classes I, II ou III.

Abréviations : PiD = Maladie de Pick, PSP = Paralyse supranucléaire progressive, DCB = Dégénérescence cortico-basale, DGA = Démence à grains agyrophiles, TGG = Tauopathie globulaire gliale (tauopathie de la substance blanche avec inclusions gliales globulaire), MA = Maladie d'Alzheimer, T21 = Démence liée à la trisomie 21, TPLV = Tauopathie primaire liée au vieillissement. D'après (Kovacs, 2015).

Une prise en charge médicale insatisfaisante

Il existe à ce jour très peu de traitements efficaces et aucun traitement curatif permettant de stopper ou même de ralentir la progression des ces maladies. La prise en charge des patients atteints de tauopathies ou de syndrome démentiel en général, est un parcours long et difficile pour les patients et leur famille. Le traitement médicamenteux consiste surtout en un traitement par L-dopa des syndromes parkinsoniens, si celui-ci est présent, avec une efficacité modérée dans les tauopathies. De plus, un traitement médicamenteux des troubles cognitifs à base d'inhibiteurs de la cholinestérase (tacrine, donépézil ou rivastigmine) peut être proposé dans les démences débutantes. Ces derniers peuvent avoir différents effets secondaires et ne sont efficaces de manière imprévisible que pour quelques individus chez qui ils ralentiraient le déclin cognitif. Le reste de la prise en charge vise à adapter les traitements médicamenteux et à stimuler les fonctions cognitives (activité physique, maintien de la vie social, groupe de stimulation de la mémoire, musicothérapie...). Tous ces traitements n'ont pas démontré leur efficacité sur la mémoire et les fonctions cognitives, mais ils présentent également l'intérêt de soulager les patients comme leur famille. En effet, ces maladies sont également éprouvantes pour les familles car celles-ci doivent également subir les conséquences du handicap et les troubles du comportement des malades atteints de démence pendant toutes les années d'évolution de la maladie. Une part importante de la prise en charge comprend donc l'aide aux aidants que ce soit une aide financière (prise en charge social), physique (hospitalisation à domicile, aides ménagères...) ou psychique (soutien psychologique).

De nombreux progrès sont encore nécessaires pour la prise en charge thérapeutiques des patients atteints de tauopathies ou d'autres maladies neurodégénératives. Toutefois, il convient de noter que beaucoup de progrès ont été réalisés pour améliorer le diagnostic clinique, radiologique, biologique et anatomopathologique. Par exemple, les marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer dans le LCS sont aujourd'hui utilisés en pratique courante dans les services de Neurologie. Le développement de nouveaux biomarqueurs biochimiques et radiologiques pourrait permettre de dépister plus précocement la MA et les autres tauopathies et permettre de les prendre en charge plus vite afin de limiter l'importance des déficits neurologiques. Le développement de nouveaux essais cliniques visant à prévenir les tauopathies dépend également de l'utilisation de nouveaux biomarqueurs suffisamment sensibles et spécifiques pour prédire ces maladies, et améliorer leur diagnostic.

Les tauopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives caractérisées par la présence dans le cerveau des patients d'agrégats intracellulaires de protéines tau anormales. Cette classification des tauopathies regroupe des maladies fréquentes et rares, héréditaires et sporadiques, avec des symptômes variés et des signes neuropathologiques spécifiques. Au final, ces 25 maladies n'ont en commun que la neurodégénérescence, leur caractère incurable à ce jour et un mécanisme physiopathologique commun, mais mal compris : l'agrégation de protéines tau anormales. Ce classement nosologique des tauopathies est donc à considérer avec précaution.

Malgré cela, le classement des maladies neurodégénératives selon le type de protéine s'accumulant dans les tissus nerveux est une avancée majeure car elle offre l'espoir de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant ces protéines et/ou les mécanismes physiopathologiques menant à cette agrégation. Dans le cas des tauopathies, un traitement limitant l'agrégation de tau qui se révélerait efficace pourrait potentiellement permettre le traitement d'autres maladies neurodégénératives liées à l'agrégation de tau et notamment la MA qui est la plus fréquente cause de démence au monde. C'est dans cette optique que de nombreux laboratoires, dont le nôtre, travaillent depuis des années.

Nous tenterons par la suite de décrire brièvement la MA, la PSP, la DCB et la maladie de Pick qui sont les tauopathies que nous avons étudiées au cours de cette thèse en pointant les principales différences et les similitudes entre ces maladies.

Chapitre 2 : Les quatre tauopathies étudiées

La maladie d'Alzheimer

Généralités

Dans le monde, les syndromes démentiels concerneraient 24,3 millions de personnes avec près de 4,6 millions de nouveaux cas chaque année, soit un nouveau cas toutes les 7 secondes (Ferri *et al.*, 2005). La MA est la plus fréquente cause de démence, particulièrement après 65 ans où elle représente environ 60-70 % des démences (Fratiglioni *et al.*, 2000). La fréquence de la MA augmente rapidement avec l'âge et va concerner 4,4 % de la population française de plus de 65 ans, pour atteindre 17,8 % des plus de 75 ans et représenter un peu moins de 80 % des causes de démences (Figure 2) (Ramaroson *et al.*, 2003; Lobo *et al.*, 2000). Pour la France, le nombre de personnes atteintes de MA est estimé à environ 850 000 personnes (rapport de l'office parlementaire d'évaluation des politiques de santé, 2005). Ce nombre de malades devrait encore doubler d'ici 20 ans avec le vieillissement de la population française et l'augmentation de l'espérance de vie. Les femmes sont plus exposées à cette maladie, mais cette différence pourrait être liée aux écarts d'espérance de vie.

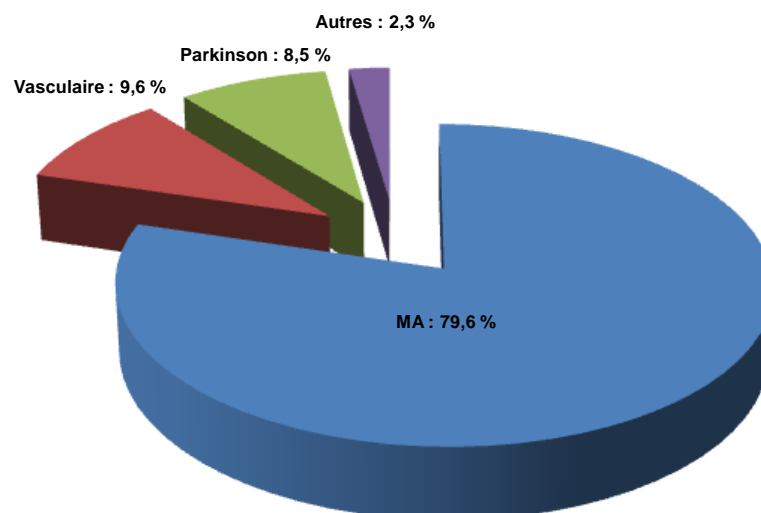


Figure 2 : Les causes de démence en France.

Proportion des différentes causes de démences en France d'après les données épidémiologiques de la cohorte française PAQUID (Ramaroson *et al.*, 2003).

Clinique

Au début de la maladie, les lésions affectent le cortex entorhinal puis l'hippocampe, conduisant à des troubles de la mémoire qui prédominent avec une perte de la mémoire à court terme (mémoire épisodique) qui contraste avec une préservation de la mémoire des faits anciens. Des troubles du langage avec un manque de mot peuvent également être observés. Par la suite, la maladie atteint d'autres régions cérébrales notamment l'isocortex associatif puis des aires corticales. D'autres fonctions cognitives sont alors affectées avec une perte progressive de la parole, des fonctions exécutives, des praxies (fonctions de coordination et d'adaptation des mouvements musculaires volontaires), des gnosies (fonctions de reconnaissance, perception et utilisation des objets grâce aux sens), de l'orientation dans le temps et l'espace, et l'apparition de troubles du comportement. Au stade final de la maladie, le patient présente un syndrome aphaso-apraxo-agnosique alors que les fonctions motrices ne sont que très tardivement altérées. La maladie est très lentement progressive avec une dégradation des fonctions cognitives conduisant le patient à un état de dépendance puis à son décès après 8-9 ans d'évolution en moyenne. La MA est en général observée chez les sujets âgés de plus de 65 ans. Il existe de rares formes familiales de MA correspondant à des maladies génétiques de transmission autosomiques dominantes avec mutation dans les gènes *PSEN1* ou *PSEN2* ou *APP*. Ces formes familiales de MA ont un tableau clinique, une évolution et des lésions histologiques similaires, mais elles débutent plus précocement avec un âge de début de la maladie presque systématiquement avant 65 ans et même avant 50 ans (Ryman *et al.*, 2014).

Examens paracliniques

L'imagerie cérébrale par IRM permet d'observer à un stade précoce une atrophie limitée aux régions parahippocampiques. Par la suite, l'atrophie progresse et atteindra également le cortex temporal. De plus en plus, sont proposées d'autres analyses d'imagerie, notamment la tomographie à émission de positons associée au scanner ou TEP-scan qui permettent d'observer une réduction du métabolisme cérébral, l'accumulation de peptide amyloïde et la DNF. Cet examen est surtout intéressant lorsque le diagnostic étiologique de la démence est incertain ou dans le cas de protocoles de recherche clinique.

Les analyses biologiques sont aussi d'un grand intérêt pour le diagnostic de MA avec le dosage de différents biomarqueurs dans le liquide cérébro-spinal (LCS) obtenu par ponction lombaire. Encore une fois, ces dosages sont surtout pratiqués lorsque le diagnostic étiologique de la démence est incertain et pour améliorer le diagnostic différentiel avec d'autres causes de démence du sujet âgé comme le syndrome dépressif majeur, un

démence secondaire à une consommation excessive d'alcool ou d'autres maladies neurodégénératives comme la DCB, la PSP, les DFT et la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Enfin, ces biomarqueurs présentent également l'intérêt de prédire le développement d'une MA chez un patient à des stades précoces de la maladie. Les marqueurs biochimiques étudiés sont les protéines tau totales, les protéines tau phosphorylée qui sont augmentés en cas de MA et du peptide amyloïde bêta de 42 acides aminés (A β 42) qui est très diminué dans la MA (Shaw *et al.*, 2011). A ces trois biomarqueurs constamment analysés, il est possible d'ajouter le dosage du peptide amyloïde bêta de 40 acides aminés (A β 40) afin de le comparer au taux d'A β 42 selon un ratio A β 42/A β 40. Ce ratio est intéressant lors de signes de déclin cognitif débutant ou MCI pour *Mild Cognitive Impairment*. En effet, la diminution de ce ratio au cours du temps est prédictif de la MA.

Examens neuropathologique et biochimique

Lors de l'examen macroscopique, est observée une atrophie du cerveau des patients avec un poids au stade de démence inférieur à 1 kg pour une normale entre 1,1 et 1,5 kg. L'atrophie prédomine dans les régions fronto-temporales avec des sillons qui sont élargis, des circonvolutions amincies et les ventricules dilatés notamment dans la zone des carrefours temporo-occipitaux. Le système hippocampo-amygdalien est particulièrement touché par l'atrophie alors que les régions corticales primaires motrices et les régions corticales primaires visuelles sont relativement épargnées.

Lors de l'examen histopathologique, sont observées une perte neuronale importante et une désorganisation de la cytoarchitecture, c'est à dire la composition cellulaire du cortex. Les examens d'immunohistochimie retrouvent essentiellement deux types de lésions histologiques qui caractérisent la MA : la DNF et les plaques séniles qui sont des lésions extracellulaires constituées de dépôts de peptide β -amyloïde. Des dépôts de peptide β -amyloïde s'accumulent dans la paroi des vaisseaux ce qui correspond à un aspect d'angiopathie amyloïde. Enfin, il est assez fréquent d'observer également des lésions ischémiques et vasculaires. De nombreuses lésions vasculaires associées à un tableau clinique compatible font évoquer une démence mixte.

Ces deux lésions histologiques principales de la MA vont concerner différentes structures cérébrales et vont se propager de proche en proche aux régions interconnectées selon des évolutions spatio-temporelles distinctes et bien définies. L'évolution de la pathologie amyloïde va être classée selon 5 phases décrites par Thal et collaborateurs (Thal *et al.*, 2002). Selon cette classification, les dépôts de peptide β -amyloïde débutent dans le néocortex (phase I), puis vont toucher successivement l'allocortex (phase II), les noyaux

diencéphaliques, le striatum, et les noyaux cholinergiques du tronc cérébral (phase III). Plusieurs noyaux du tronc cérébral sont atteints lors de la phase IV. Enfin la phase V correspond à l'atteinte du cervelet (Figure 3).

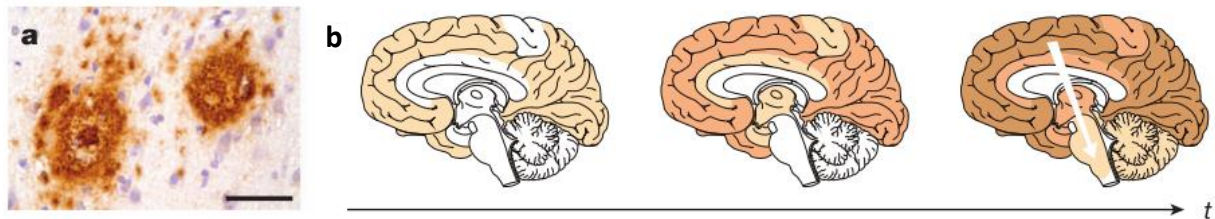


Figure 3 : Classification de Thal.

A. Dépôts de peptide β -amyloïde sous la forme de plaques séniles dans le néocortex d'un patient souffrant de la maladie d'Alzheimer. L'échelle est de 50 μ m. **B.** Progression caractéristique des lésions histologiques liée aux dépôts de peptide β -amyloïde au fil du temps. Le temps d'évolution de la pathologie est représenté par un axe t sous la forme d'une flèche noire. La coloration orange-brun représente la localisation et l'importance des dépôts amyloïde dans l'ensemble du cerveau. Les trois cerveaux représentent de gauche à droite les phases I, II-III et IV-V de la classification de Thal. La flèche blanche représente la progression générale des lésions histologiques débutant au néocortex puis atteignant les noyaux gris centraux et enfin le tronc cérébral, le cervelet (Jucker & Walker, 2013).

Il est important de noter que les déficits neurologiques et donc les signes cliniques de la MA ne corrélerent pas bien avec la pathologie amyloïde à l'inverse de la pathologie Tau. La pathologie tau dans la MA va également suivre un chemin séquentiel de propagation bien déterminé classé en 10 stades selon la classification de Delacourte (Delacourte *et al.*, 1999) et 6 stades selon la classification de Braak (Braak & Braak, 1991). C'est cette classification de Braak qui est la plus utilisée en pratique courante. Les structures cérébrales les plus vulnérables et les premières touchées par la DNF sont le locus coeruleus et le cortex transentorhinal. L'atteinte isolée du cortex transentorhinal puis du cortex enthorinal correspond aux stades I et II de Braak. À noter que ces deux stades sont cliniquement asymptomatiques. De plus, la présence d'une pathologie tau dans le cortex transentorhinal après 75 ans est très fréquente et s'apparente à un vieillissement cérébral normal. Le stade III correspond à une atteinte débutante de l'hippocampe. Lors du stade IV, la DNF concerne l'ensemble de l'hippocampe et s'étend au cortex temporal et les régions limbiques puis à toutes les régions corticales associatives polymodales (cortex frontal antérieur, cortex temporal supérieur et cortex pariétal inférieur). Les stades III et IV correspondent au début de la MA et se traduisent au niveau clinique par les troubles cognitifs légers (MCI). Enfin les stades V et VI correspondent à une atteinte importante de l'isocortex, limitée aux régions

unimodales puis touchant l'ensemble du cortex (Figure 4). Les régions corticales primaires, visuelles et/ou motrices sont parmi les dernières régions cérébrales atteintes par la maladie. Ces deux stades V et VI se traduisent sur le plan clinique par un syndrome démentiel modéré lors du stade V puis sévère au stade VI. Enfin, au niveau biochimique, il est possible d'observer une agrégation de l'ensemble des isoformes de protéine Tau. Le ratio entre les isoformes 3R et 4R est de 1.

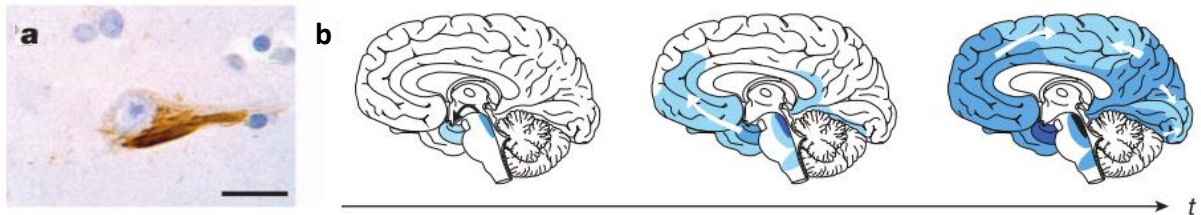


Figure 4 : Stades de Braak.

A. Dépôts de protéines tau anormales dans un neurone cortical d'un patient souffrant de la maladie d'Alzheimer. L'inclusion neuronale de protéines tau enchevêtrées signe la dégénérescence neurofibrillaire. L'échelle est de 20 μm . **B.** Progression caractéristique des lésions histologiques liée aux dépôts de protéines tau anormales au fil du temps. Le temps d'évolution de la pathologie est représenté par un axe t sous la forme d'une flèche noire. La coloration bleu-violet représente la localisation et l'importance des dépôts de protéines tau anormales dans l'ensemble du cerveau. Les trois cerveaux représentent de gauche à droite les stades I-II, III-IV et V-VI de la classification de Braak. Les flèches blanches représentent la progression générale des lésions histologiques débutant au niveau du locus coeruleus et du cortex transentorhinal puis atteignant les régions hippocampiques, limbiques et fronto-temporale puis enfin l'ensemble du cortex (Jucker & Walker, 2013).

Une MA ou plusieurs MA?

La description que nous avons faite de la MA correspond à la grande majorité des cas, mais il est possible d'observer des différences dans le tableau clinique et/ou neuropathologique selon les individus. Ces différences peuvent être liées à l'existence d'autres pathologies du SNC associées, au capital cérébral propre à chaque individu ou encore à la topographie des lésions. Enfin, il convient de définir le concept de MA en prenant en compte l'évolution de la maladie dans ces stades les plus précoces et avant-coureurs de la maladie avérée.

Environ 20 % des patients atteints de démences présentent une démence mixte qui associe donc des lésions vasculaires à la MA. Ces patients ont un tableau clinique enrichi par différents signes de la démence vasculaire comme l'incontinence urinaire ou le syndrome frontal. L'examen neuropathologique observe d'ailleurs des lésions vasculaires et ischémiques plus fréquentes et de plus en plus nombreuses avec le vieillissement cérébral. Il

serait donc plus juste dans le cas des démences mixtes de parler d'une combinaison de démences avec des implications variables de la MA et des causes vasculaires.

Ensuite, l'expression et la rapidité d'évolution de la MA chez les patients peut différer d'un malade à l'autre. Cela peut s'expliquer par une atteinte des différentes régions cérébrales qui peut varier selon son intensité et son évolution. Cette évolution dépend de la réserve cognitive. Cette réserve cognitive correspond à l'accumulation au cours de l'existence de connaissances et d'acquis cognitifs qui sont variables selon les individus. Une réserve cognitive plus importante chez les patients permettrait de compenser les effets de la perte neuronale en mettant en jeu d'autres circuits neuronaux.

Un autre mécanisme qui pourrait expliquer la variabilité des symptômes observés dans la MA est lié à la variabilité des lésions dégénératives. Dans une étude portant sur 152 MA débutantes, Noh et collaborateurs ont pu montrer que la neurodégénérescence visualisée par une diminution de l'épaisseur corticale en IRM était très différente d'un individu à l'autre et qu'elle impactait de manière variable les différentes structures anatomiques du cerveau. Les auteurs ont ensuite regroupé les patients selon des groupes de sous-types d'atrophie et ont pu démontrer que ces différents sous-types anatomiques (atrophie diffuse, prédominance temporale médiale, prédominance pariétale) présentent des caractéristiques cliniques distinctes (Noh *et al.*, 2014).

La paralysie supranucléaire progressive

Généralités

La PSP (ou maladie de Steele-Richardson-Olszewski) est une maladie neurodégénérative rare touchant principalement la motricité et caractérisée par des chutes, une rigidité axiale, une bradykinésie et une ophtalmoplégie supranucléaire verticale qui donne son nom à la maladie. Ce dernier symptôme correspond à la faiblesse des muscles oculomoteurs permettant de bouger les globes oculaires de haut en bas et qui tient son origine d'une neurodégénérescence de neurones regroupés en noyau au niveau du tronc cérébral (noyaux rostraux interstitiels du faisceau longitudinal médian). Le début des troubles neurologiques est tardif et observé généralement dans la 6^{ème} ou 7^{ème} décennie, avec une moyenne de 65 ans (Respondek *et al.*, 2014). Par la suite la maladie progresse avec l'apparition de troubles de la déglutition, de la parole, une démence légère, puis aboutit au décès des patients après une durée d'évolution moyenne de 8,7 ans (Respondek *et al.*, 2014). La PSP est une maladie très hétérogène et de nombreuses formes ont été décrites. Elle fait partie du sous-groupe d'atrophies corticales focales touchant les lobes frontaux et temporaux (DLFT) au même titre que la DCB et la maladie de Pick. La PSP dans sa forme classique également nommée syndrome de Richardson ressemble beaucoup à la DCB tant sur le plan clinique, génétique, biochimique et histologique. Il est très difficile de distinguer les deux maladies du vivant des patients et de récentes études suggèrent que la DCB serait un sous-type de PSP (Kouri *et al.*, 2014). L'incidence de la PSP est de 1,2 nouveaux cas pour 100 000 habitants, par an. Sa prévalence est estimée entre 5 et 6 / 100 000 (Nath *et al.*, 2001) avec un sex-ratio de 1. La génétique semble avoir un rôle important comme facteur de susceptibilité. En effet, la PSP est fréquemment associée à l'un des deux haplotypes du gène *MAPT*, H1/H2, définis par l'inversion polymorphe d'une large région génomique contenant notamment le gène *MAPT*. L'haplotype H2 correspond à l'inversion de cette région par rapport à la forme originale, représentée par l'haplotype H1. Les patients PSP possèdent plus fréquemment l'haplotype H1 (95 %) par rapport à la population générale (77,5 %) (Höglinger *et al.*, 2011). Cette association génétique est tellement forte que l'haplotype H1 a pendant des années été considéré comme nécessaire mais pas suffisant pour la survenue de la PSP (Baker *et al.*, 1999). Au sein de l'haplotype H1, le sous-haplotype H1c défini par le polymorphisme de type SNP rs242557, est plus fortement associé à la survenue de la PSP (Rademakers *et al.*, 2005). De très rares formes familiales de PSP ont été rapportées dans la littérature (de Yébenes *et al.*, 1995) pouvant indiquer que de rares PSP sont d'origine génétique. De plus, des mutations du gène *MAPT* ont été décrites comme responsables de PSP (Poorkaj *et al.*, 2002; Nicholl *et al.*, 2003). Certains facteurs

environnementaux pourraient aussi jouer un rôle dans la survenue de la maladie. En effet, Caparros-Lefebvre et collaborateurs ont rapportés un cluster de tauopathies similaires à la PSP en Guadeloupe. Cette accumulation surprenante de PSP dans cette île pourrait être liée à l'exposition à certaines plantes tropicales, toxiques pour la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002). Malgré ces quelques descriptions, dans l'immense majorité des cas, la PSP est sporadique et n'a pas d'étiologie connue.

Clinique

La paralysie supranucléaire progressive classique, ou syndrome de Richardson, est la variante clinique la plus fréquente de PSP. Le syndrome de Richardson se manifeste par une instabilité posturale avec chutes, une ophtalmoplégie verticale supranucléaire pouvant se manifester au début par une lenteur des saccades oculaires verticales. En plus de ces signes assez spécifiques, les patients présentent d'autres troubles oculaires (sècheresse et rougeur des conjonctives, vision floue, clignements spontanés des paupières, photophobie), une dysarthrie, des troubles de déglutition, un syndrome dysexécutif et pour plus de la moitié des cas un changement de personnalité et/ou un ralentissement cognitif (Williams & Lees, 2009). Par la suite, les déficits moteurs et cognitifs deviennent de plus en plus importants et handicapants avec une voix qui devient inintelligible, la nécessité de se déplacer en fauteuil roulant, le recours à une gastrostomie d'alimentation et une démence. La démence dans la PSP correspondra à une démence sous-corticale avec une symptomatologie liée à l'atteinte des lobes frontaux. Les patients ont notamment des troubles mnésiques, une bradypsychie, des troubles attentionnels et de la personnalité. Une seconde forme clinique représentant une importante proportion de PSP est la PSP avec parkinsonisme. Dans cette forme de la maladie, les patients vont présenter un syndrome parkinsonien dès le début de la maladie, caractérisé par une rigidité, une bradykinésie et parfois un tremblement. Certains de ces symptômes peuvent même parfois répondre au traitement par L-Dopa. C'est pourquoi la PSP peut parfois être confondue avec une maladie de Parkinson. L'évolution rapide des signes moteurs, la réponse peu efficace à la L-Dopa, la présence de signes oculomoteurs ou un déficit cognitif plus précoce peuvent aider à faire la différence avec la maladie de Parkinson. Les autres formes cliniques moins fréquentes de PSP traduisent l'hétérogénéité de cette maladie. En effet, chez certains malades, le tableau clinique est dominé par des troubles de la parole (PSP avec aphasie progressive non fluente), des troubles du comportement mimant une DLFT, des signes cérébelleux ou encore une akinésie et un freezing (Respondek *et al.*, 2014; Williams & Lees, 2009). Enfin, il est difficile de différencier la PSP d'autres tauopathies similaires comme la DCB, le parkinsonisme de Guadeloupe ou encore certains cas de FTDP-17.

Examens paracliniques

L'imagerie cérébrale par IRM +/- associée au TEP-scan sont utiles pour orienter le diagnostic. Il est possible d'observer dans la PSP une atrophie mésencéphalique avec un élargissement du quatrième ventricule situé en dessous ainsi qu'un hypersignal en séquence T2 au niveau du pallidum interne et/ou bordant le putamen. Un enregistrement de l'oculomotricité afin de rechercher un ralentissement des saccades verticales peut se révéler utile. Les biomarqueurs du LCS retrouvent des protéines tau totales et phosphorylées augmentées et avec un taux de peptide A β 42 normal.

Examens neuropathologique et biochimique

Le diagnostic final est posé sur l'examen neuropathologique avec la présence d'une atrophie marquée des noyaux subthalamiques et du mésencéphale concernant particulièrement la substance noire. Le cortex moteur peut aussi être atrophié. La pathologie tau touche différentes structures sous-corticales (noyaux subthalamiques, noyaux de la base et le tronc cérébral). L'examen immunohistologique permet de mettre en évidence une pathologie tau concernant les neurones et les cellules gliales. De manière variable mais assez caractéristique, il est possible d'observer des astrocytes en touffes et des inclusions en bobine de protéines tau dans les oligodendrocytes. Les protéines tau agrégées sont uniquement des isoformes 4R. Les lobes frontaux pariétaux, le pont, le noyau dentelé du cervelet et la substance blanche du cervelet peuvent être différemment touchées. Les patients présentant une forme clinique de type PSP avec syndrome parkinsonien ou une akinésie pure et freezing auraient une atteinte histologique moins étendue à l'ensemble du cortex par rapport aux patients présentant un syndrome de Richardson (Figure 5) (Williams *et al.*, 2007). Certains auteurs ont proposé que la pathologie tau dans la PSP pouvait se propager entre différentes régions cérébrales comme c'est le cas pour la MA (Verny *et al.*, 1996). Certaines expériences ayant consisté en des injections d'extraits de protéines tau agrégées issues de patients atteints de PSP dans des cerveaux murins sont en faveur de cette hypothèse (Clavaguera *et al.*, 2009). Mais dans une grande série de cas, Williams et collaborateurs n'observent qu'une faible corrélation ($p = 0,028$ et $r = -0,36$) entre la durée d'évolution de la PSP et l'étendue de la pathologie tau. De plus, cette corrélation est négative ce qui pourrait faire penser que les patients PSP avec une longue évolution de leur maladie ont une pathologie tau moins étendue (Williams *et al.*, 2007). L'existence d'une propagation des protéines tau agrégées dans la PSP est donc très controversée.

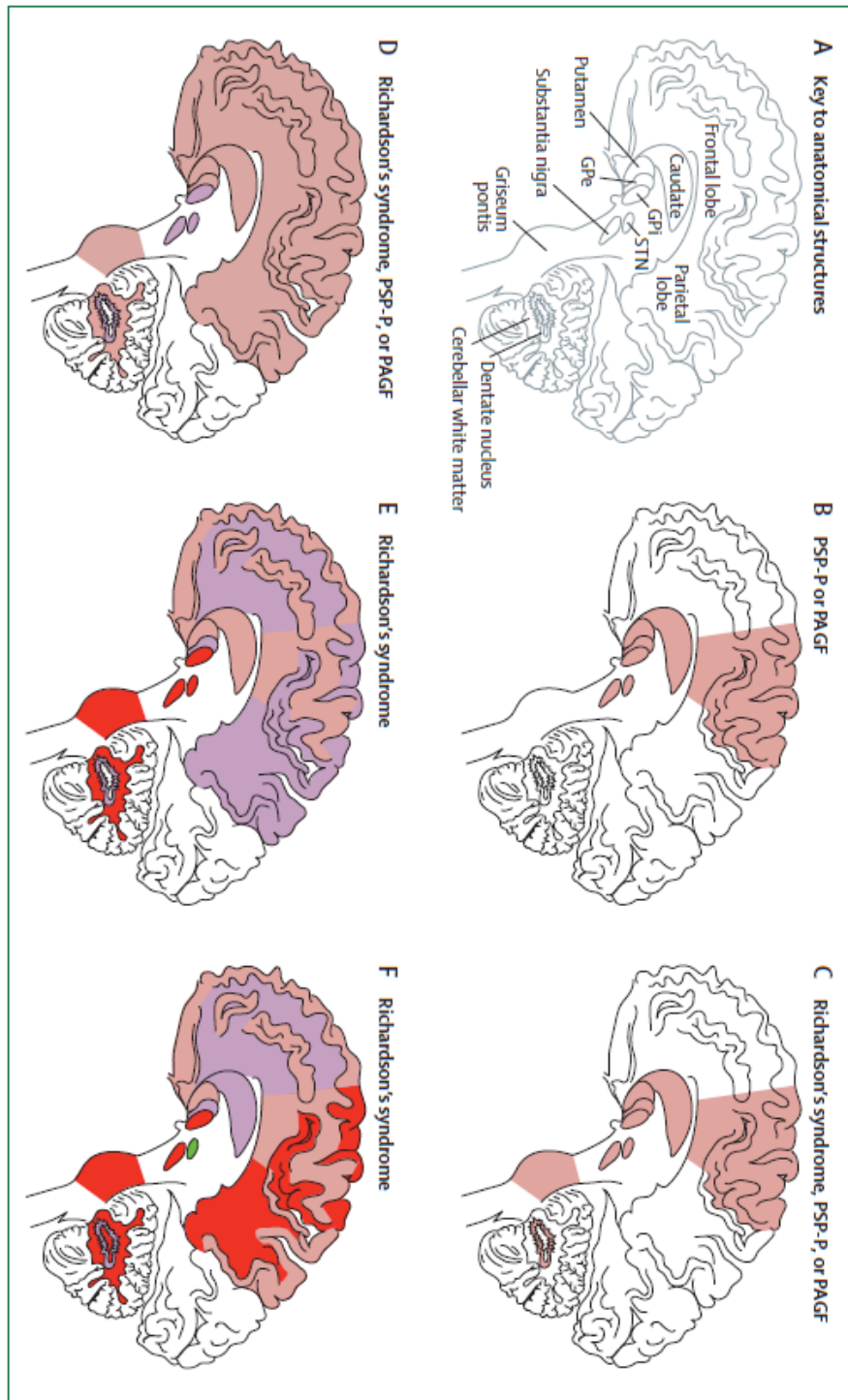


Figure 5 : Répartition de la pathologie tau selon les formes de PSP.

La coloration rose-violet-rouge-vert représente la localisation et l'importance des dépôts de protéines tau anormales dans l'ensemble du cerveau selon le sous-type de PSP. Rose = Pathologie tau légère, violet = Pathologie tau modérée, rouge = Pathologie tau sévère. Vert = Pathologie tau très sévère.

Abréviations : PSP = Paralyse supranucléaire progressive, PSP-P = PSP avec syndrome parkinsonien, PAGF = akinésie pure avec freezing. STN = Noyau subthalamique, GPi = Globus pallidus interne, GPe = Globus pallidus externe (Williams & Lees, 2009).

La dégénérescence cortico-basale

Généralités

La DCB est une maladie neurodégénérative rare et progressive débutant habituellement entre 50 et 70 ans. La démence est associée à une atteinte motrice avec notamment un syndrome parkinsonien atypique. La prévalence de cette maladie rare est difficile à mesurer avec précision et estimée entre 4,9 et 7,3 cas pour 100 000 personnes (Winter *et al.*, 2010). Il n'existe pas d'étiologie connue à la DCB ni de traitement efficace. La maladie est létale avec une évolution progressive sur 7 ans en moyenne. Il n'a pas été rapporté de formes familiales de cette maladie. Il existe cependant des facteurs de susceptibilité génétique communs entre la DCB et la PSP avec notamment une fréquence plus élevée de l'haplotype H1 et du sous-haplotype H1c au niveau locus du gène *MAPT*. Hommes et femmes sont touchés également par cette maladie.

Clinique

La DCB est caractérisée par l'association hétérogène de symptômes moteurs, sensitifs, cognitifs et comportementaux qui en font une maladie très difficile à diagnostiquer avec précision du vivant des patients. En effet, les symptômes de la maladie sont avant tout liés à une atrophie corticale focale à laquelle est associée une atteinte sous-corticale variable d'un patient à l'autre. Un patient atteint de DCB pourra ainsi présenter fréquemment un syndrome cortico-basal, mais aussi un syndrome de Richardson, une aphasia progressive, une atrophie corticale postérieure, ou même un syndrome démentiel mimant une MA ou une DLFT. Cette présentation clinique très variable et la difficulté à porter un diagnostic fiable ne permet pas à l'examen clinique seul de poser le diagnostic de DCB. Néanmoins, l'existence d'un syndrome cortico-basal est une indication importante. Ce syndrome est défini par l'installation progressive d'une apraxie et d'une rigidité asymétrique, associées à d'autres signes liés à l'atteinte corticale ou des ganglions de la base comme une aphasia, une apraxie oculomotrice, des anomalies de la posture (dystonie), des myoclonies, un syndrome de la "main étrangère" et des troubles sensitifs corticaux. Les patients présentent également un syndrome parkinsonien atypique, répondant pas ou peu à la L-dopa. L'atteinte motrice asymétrique évolue progressivement et va ensuite s'étendre aux deux côtés. Initialement, il n'y a pas de troubles cognitifs majeurs, ni d'atteinte de la mémoire, mais vont progressivement apparaître des troubles cognitifs et des troubles du comportement liés à l'atteinte du cortex frontal.

Examens paracliniques

L'IRM cérébrale permet d'objectiver une atrophie du cortex pariétal et frontal, souvent asymétrique. Mais il est aussi possible d'observer différentes formes d'atrophies focales pouvant refléter l'hétérogénéité des signes cliniques. Les biomarqueurs du LCS ont un profil différent de la MA avec des protéines tau totales et phosphorylées augmentées contrastant avec un taux de peptide A β 42 normal.

Examens neuropathologique et biochimique

Lors de l'examen macroscopique, le cerveau des patients présente une atrophie focale, touchant volontiers les régions fronto-temporales. L'examen immunohistologique permet de poser le diagnostic avec la mise en évidence de NFT dans la matière grise et blanche du cortex, les noyaux gris centraux, le diencephale et le tronc cérébral. La pathologie tau touche à la fois les neurones et les cellules gliales. Les protéines tau agrégées sont les isoformes 3R et 4R avec un ratio 3R/4R d'environ 1/2. Un diagnostic différentiel de PSP peut être évoqué à l'examen immunohistologique, particulièrement devant la pathologie tau 4R et l'association de lésions neuronales et gliales. La différence entre les deux maladies est portée sur la nature des lésions histologiques touchant les astrocytes qui prennent la forme de plaques astrocytaires dans la DCB et d'astrocytes en touffe dans la PSP (Figure 6).

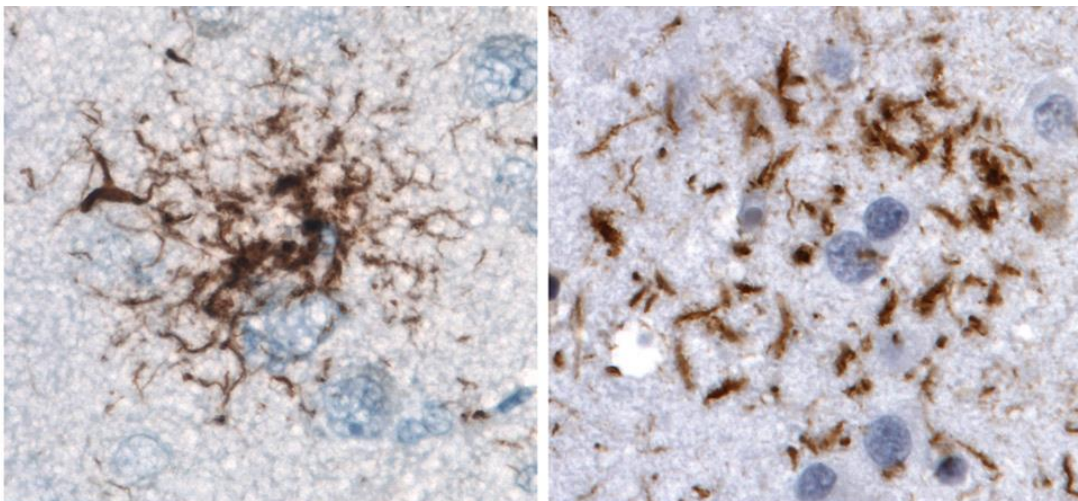


Figure 6 : Lésions histologiques astrocytaires de la PSP et de la DCB.

Astrocytes en touffe de la PSP (à gauche) et plaques astrocytaires de DCB (à droite) (Bang *et al.*, 2015).

La maladie de Pick

Généralités

La maladie de Pick est une maladie neurodégénérative appartenant au sous-groupe des dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT). La maladie de Pick est une maladie orpheline très rare. En effet, dans une grande étude rétrospective totalisant 250 DLFT, la maladie de Pick, confirmée par examen neuropathologique ne correspondait qu'à 21 patients (Piguet *et al.*, 2011). Or l'ensemble des patients atteints de DLFT est estimé à environ 6000 patients en France. Il est donc raisonnable de penser que la maladie de Pick doit être limitée à quelques centaines de cas en France, soit bien peu par rapport au 900 000 patients atteints de MA. En raison du nombre limité de patients, les données épidémiologiques existantes concernant cette maladie sont à considérer avec précaution. Il semble cependant que la maladie de Pick soit bien plus précoce que la MA avec un âge moyen de survenu d'environ 60 ans et une évolution progressive aboutissant au décès des patients après 9 ans d'évolution en moyenne (Piguet *et al.*, 2011). Plusieurs articles ont rapporté des formes familiales de maladies de Pick liées à des mutations du gène *MAPT* (Neumann *et al.*, 2001). Un article a également rapporté une forme familiale de maladie de Pick présentant une mutation du gène *PSEN1*, un gène habituellement responsable de formes familiales et précoces de MA (Dermaut *et al.*, 2004). Mais en dehors de ces quelques descriptions, la majorité des patients n'ont pas d'antécédents familiaux de démences et n'ont pas d'étiologie connue. Enfin, la maladie de Pick n'est pas associée à une plus grande fréquence d'haplotype H1 comme c'est le cas pour la PSP et la DCB (Morris *et al.*, 2002).

Clinique

La clinique est dominée par des troubles du langage et des troubles du comportement. Les patients n'ont classiquement pas d'atteinte de la mémoire ni de désorientation temporo-spatiale au début de la maladie. Mais les déficits neurologiques que présenteront les patients sont très variables d'un individu à l'autre. De plus, le tableau clinique de la maladie de Pick se confond en tout point avec celui des autres DLFT. Il n'est pas possible en pratique courante de différencier ces types de démences et le diagnostic précis du type de DFLT ne peut être réalisé que lors de l'examen neuropathologique ou par analyse moléculaire des gènes impliqués dans les autres DLFT comme les gènes *MAPT*, *C1orf72*, *GRN*, *TARDBP*, *FUS*, *VCP*, et *CHMP2B*, (Bang *et al.*, 2015). Au niveau clinique, la maladie de Pick et les DFLT de manière générale peuvent se manifester selon deux grands tableaux cliniques : l'aphasie primaire progressive et la variante comportementale des DFLT.

Dans l'aphasie primaire progressive prédominent les troubles du langage avec notamment un manque du mot, une perte du sens des mots, de la syntaxe et/ou de l'élocution. L'ensemble de ces signes est en rapport avec une atteinte des lobes temporaux. La variante comportementale correspond à des changements importants de la personnalité. Nombre des signes peuvent entrer dans le cadre d'un syndrome frontal. Les lobes frontaux sont particulièrement atteints dans les formes comportementales. Il est possible alors d'observer des troubles de l'humeur à type d'apathie, repli sur soi, désintérêt, négligence de soi et des autres pouvant faire évoquer un syndrome dépressif majeur ou au contraire une désinhibition, une perte des convenances sociales, perte de l'empathie et/ou une irritabilité. Ces symptômes psychiatriques peuvent faire errer le diagnostic vers une psychose (schizophrénie tardive) ou un syndrome dépressif mimant une démence. Il est également possible d'observer des comportements répétitifs et/ou ritualisés, une hyperoralité et des troubles du comportement alimentaire (grignotage, boulimie, goût marqué pour le sucre). La maladie évolue avec une perte complète de la parole (mutisme), l'apparition d'une incontinence et un déclin cognitif progressif. Les troubles cognitifs comportent notamment des troubles de l'attention, une acalculie et des troubles mnésiques.

Examens paracliniques

L'imagerie cérébrale par IRM présente un aspect non spécifique de DLFT avec une atrophie focale limitée aux lobes frontaux et temporaux. Le PET-scan permet d'objectiver des anomalies métaboliques et/ou une diminution du flux sanguin localisé au niveau des lobes frontaux et temporaux.

Examens neuropathologique et biochimique

Lors de l'examen macroscopique, le cerveau des patients présente une atrophie importante des lobes frontaux et temporaux. L'examen immunohistologique retrouve une pathologie tau intraneuronale sous la forme d'inclusions somatiques arrondies très denses et juxtanucléaire de protéines tau agrégées. Ces lésions histologiques portent le nom de corps de Pick (Figure 7) et sont pathognomoniques de la maladie de Pick. Certaines inclusions plus ou moins arrondies observées dans de rares formes de DCB, de PSP ou de FTDP-17 peuvent avoir très rarement un aspect similaire. La maladie de Pick présente également la caractéristique de ne comporter que des isoformes 3R de protéines tau agrégées. C'est une différence majeure avec d'autres tauopathies proches comme la DCB ou la PSP qui présentent des isoformes 4R de tau agrégées. Il existe toutefois des exceptions puisque

certaines études ont décrit des isoformes 4R comme seul composant des corps de Pick (Zhukareva *et al.*, 2002).

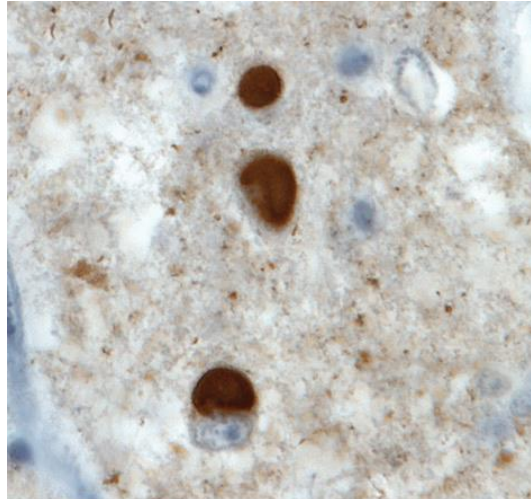


Figure 7 : Corps de Pick.

(Bang *et al.*, 2015)

La description que nous avons faite de ces quatre tauopathies reflète bien l'hétérogénéité de ce groupe de maladie, tant au plan clinique, biochimique, étiologique et des facteurs de risque. Un autre point intéressant est la variabilité de la pathologie tau observée dans ces pathologies. En effet, dans la MA, la pathologie tau se propage entre structures cérébrales connectées, concerne l'ensemble des isoformes de protéine tau et semble secondaire à la pathologie amyloïde. A l'inverse, la pathologie tau de la PSP, de la DCB et de la maladie de Pick est plutôt focale, concerne certaines isoformes spécifiques, tantôt 3R ou 4R. Enfin dans ces trois maladies, la pathologie tau est la principale lésion observée.

Nous ne savons pas très bien aujourd'hui comment une même protéine peut concerner des pathologies si différentes avec des lésions histologiques si particulières. Pour tenter de répondre à cette question, il nous faut comprendre ce que sont les protéines tau, leurs fonctions, leurs structures, les différentes isoformes et le gène dont elles sont issues.

Chapitre 3 : Du gène *MAPT* aux protéines tau

Le gène *MAPT*

Généralités

Le gène *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein Tau*) qui code les protéines tau a été cloné en 1986 et localisé sur le bras long du chromosome 17 en 17q21.31 (Neve *et al.*, 1986). Les premières descriptions du gène avaient indiqué la présence de 16 exons avec un exon 13 scindé en deux parties, l'une codante et l'autre comportant l'ensemble de la région 3'UTR. Malheureusement, cette représentation erronée de 16 exons est encore très fréquente dans les publications actuelles (Andreadis, 2005). Nous retiendrons toutefois que le gène *MAPT* mesure près de 134 kb et comprend 15 exons le plus souvent numérotés de 0 à 13. Les séquences codantes sont portées par les exons 1 à 13. Le premier exon est généralement dénommé exon 0 et est totalement non codant. Une partie des exons 1 et 13 sont également non codants.

Le locus du gène *MAPT* comprend au moins quatre autres gènes internes au gène *MAPT*. Parmi ces quatre autres gènes, seul le petit gène *STH* composé d'un unique exon et situé dans l'intron 9 de *MAPT* code pour une protéine dénommée Saitohin dont la fonction est inconnue à ce jour. Les trois autres gènes du locus de *MAPT* codent pour des ARN non codant : *MAPT-IT1* qui est transcrit dans le même sens que le gène *MAPT* et *MAPT-AS1* et *RP11-669E14.4* qui sont transcrits en antisens par rapport à *MAPT* (Figure 8).

Le gène *MAPT* est très conservé au cours de l'évolution des espèces jusqu'à *C. Elegans*. L'homologie entre la séquence protéique humaine et celle des primates est de 97 % à 100 %. Cette conservation au cours de l'évolution des espèces concerne tout particulièrement les séquences géniques codant les domaines de liaison aux microtubules et la région C-terminale des protéines tau (Sündermann *et al.*, 2016).

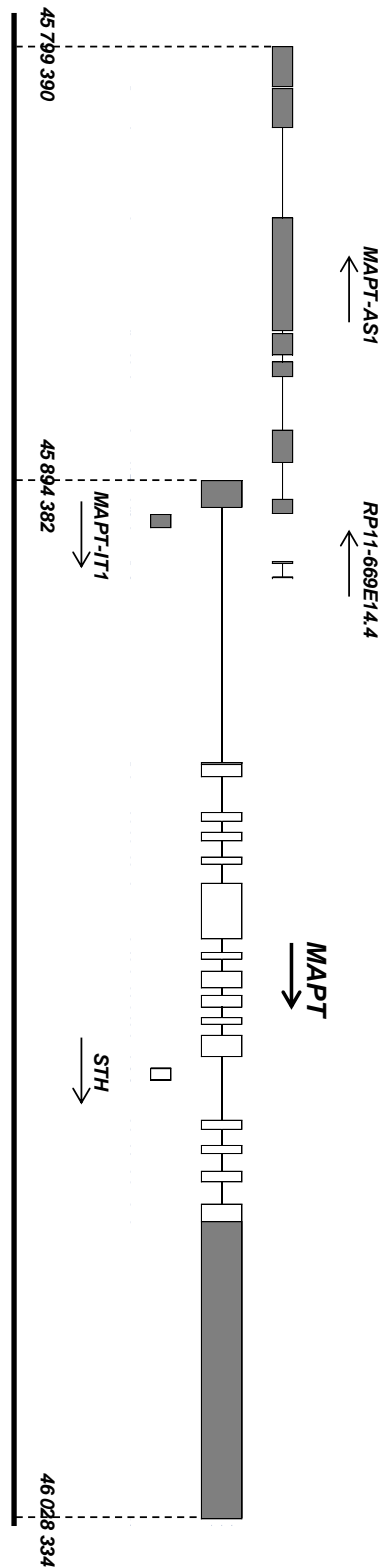


Figure 8 : Les gènes du locus de *MAPT*.

Le gène *MAPT* et les 4 autres gènes du locus : *STH*, *MAPT-AS1*, *MAPT-IT1* et *RP11-669E14.4*. Les rectangles représentent les exons et les lignes les introns des gènes. Les exons ou parties d'exons colorés en gris ne sont pas traduits en protéines. Les flèches représentent le sens de transcription des gènes. Les localisations sur le génome du début du gène *MAPT* ainsi que de la fin des gènes *MAPT* et *MAPT-AS1* sont notées en pb selon la version GRCh38.p7 du génome humain.

Expression

Les transcrits du gène *MAPT* ont initialement été décrits dans les neurones du cerveau de manière variable selon le type de neurones et le stade de développement (Drubin & Kirschner, 1986). Le cerveau constitue le tissu où l'expression est la plus importante. Cependant, l'expression des ARNm de *MAPT* et des différentes isoformes de protéines tau n'est pas limitée au seul système nerveux. Par exemple, la base de données Genecard compilant les résultats d'expériences de transcriptomique et protéomique de très nombreux gènes humains dans de nombreux tissus, rapporte une expression de *MAPT* détectée dans le SNC, mais aussi à niveau plus faible dans de nombreux tissus parmi lesquels le muscle squelettique, le cœur, le tissu rénal ou encore la peau (Figure 9).

Les protéines tau sont surtout exprimées dans le SNC et le SNP notamment dans les neurones (Schoenfeld *et al.*, 1994), mais elles sont également observées dans d'autres tissus en conditions pathologiques comme le muscle (Maurage *et al.*, 2004), la prostate (Souters & Lee, 2009) et le sein (Rouzier *et al.*, 2005). Les protéines tau sont très peu étudiées chez l'humain en dehors du système nerveux, mais les données récentes de protéomique utilisant la spectrométrie de masse rapportent une expression protéique dans de nombreux tissus (Wang *et al.*, 2012) (Figure 10). Chez le rat, les études d'expression des protéines tau ont aussi objectivé une expression protéique dans de nombreux tissus périphériques (Gu *et al.*, 1996). Cette étude chez le rat et les données de protéomique laissent donc à penser que les protéines tau pourraient avoir une expression dans de nombreux tissus chez l'humain.

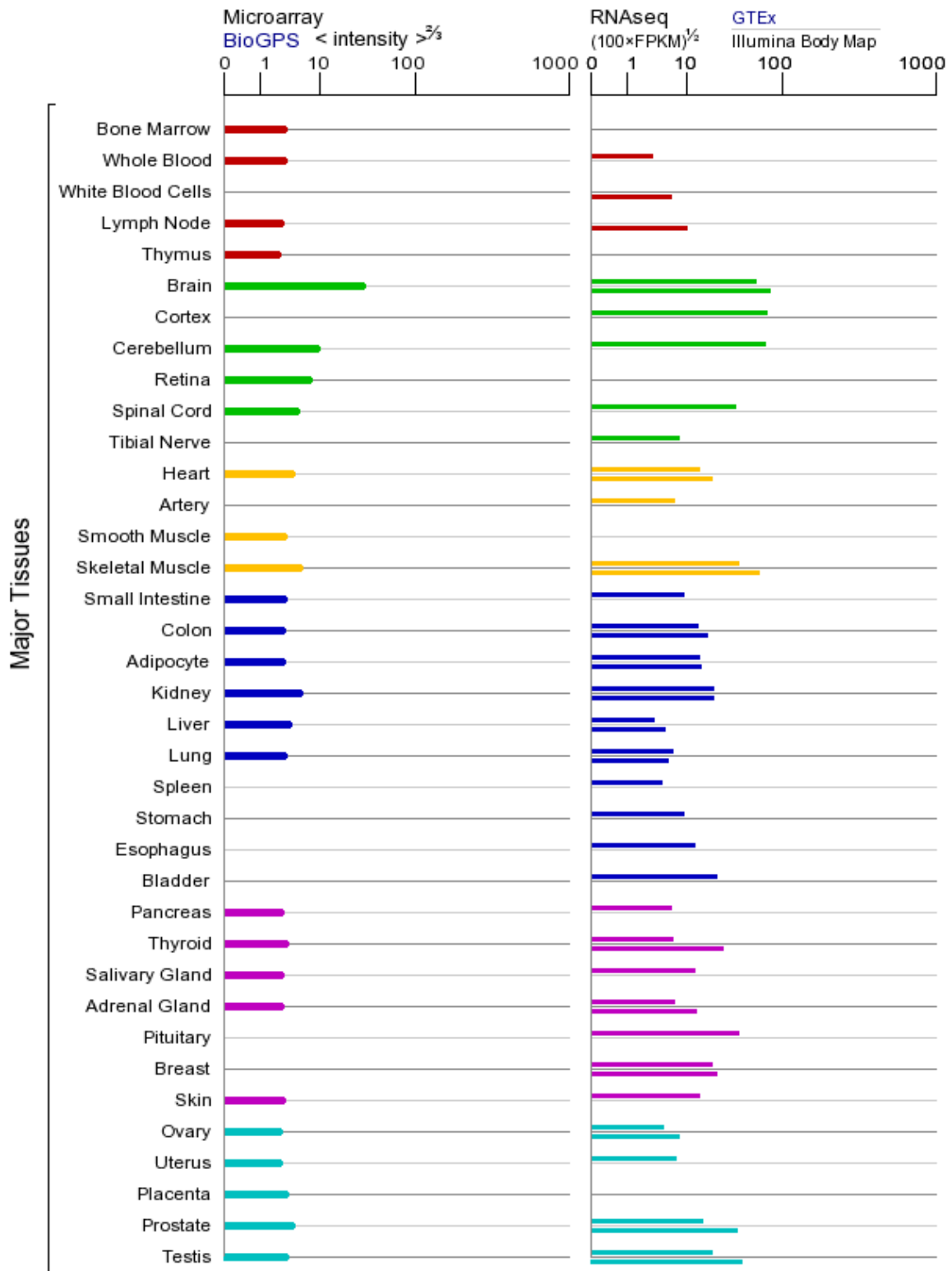


Figure 9 : Expression des ARNm de *MAPT* dans les tissus humains.

Les différents tissus testés sont listés sur l'axe des ordonnées avec les couleurs rouge pour les tissus liés au système immunitaire, vert pour le système nerveux, jaune pour le système musculaire, bleu pour les tissus internes, rose pour les tissus sécrétoires et turquoise pour les tissus liés à la reproduction. L'axe des abscisses en échelle logarithmique représente l'intensité de l'expression des ARNm de *MAPT*, selon les techniques de microarray (à gauche) et de RNAseq (à droite). D'après la base de données GeneCards <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=mapt>.

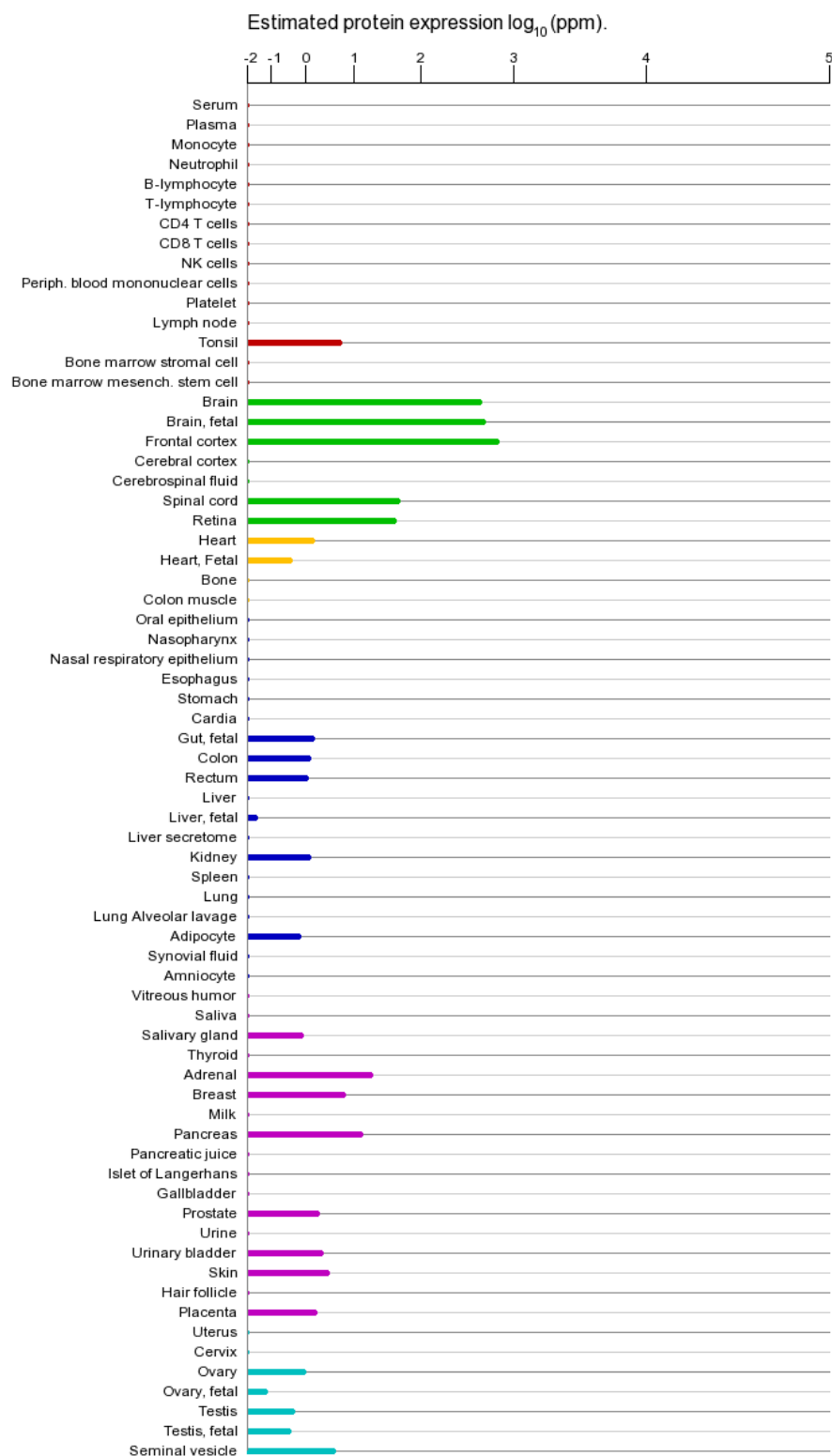


Figure 10 : Expression des protéines tau dans les tissus humains.

Les différents tissus testés sont listés sur l'axe des ordonnées avec les couleurs rouge pour le sang et les tissus liés au système immunitaire, vert pour le système nerveux, jaune pour les tissu musculo-squelettiques, bleu pour les tissus internes, rose pour les tissus sécrétoires et turquoise pour les tissus liés à la reproduction. L'axe des abscisses en échelle logarithmique représente l'intensité de l'expression des protéines tau mesurées par spectrométrie de masse. D'après la base de données GeneCards <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=mapt>.

Epissage alternatif

Les différents transcrits du gène *MAPT* subissent un épissage alternatif complexe. Les exons soumis à un épissage alternatif sont les exons 2, 3, 4a, 6, 8 et 10 (Figure 11 A).

Exons alternatifs 4a et 8

Parmi les exons alternatifs du gène, certains ne sont exprimés que dans les tissus périphériques ou sont très rarement exprimés comme les exons 4a et 8. L'inclusion des séquences codantes du grand exon 4a est traduite en des protéines de 758 ou 776 acides aminés. Ces grands protéines tau sont parfois appelée "*Big tau*" et ne sont exprimées que dans le système nerveux périphérique et la rétine (Goedert *et al.*, 1992; Nuñez & Fisher, 1997). A noter que l'exon 4A possède deux sites donneurs d'épissage en 5'. Ces deux sites alternatifs en 5' définissent les exons 4A et exon 4A_{Long}. L'exon 8 n'est exprimé que chez certains mammifères comme le bovin (Chen *et al.*, 1994) et n'a pas été rapporté dans la littérature comme inclus dans des transcrits humains. Cependant, sa description parmi les transcrits humain répertoriés dans la base de données Ensembl (transcrits [ENST00000415613](#) et [ENST00000344290](#)) laisse à penser que l'exon 8 pourrait être rarement exprimé chez l'homme. Par la suite, les isoformes et les transcrits protéiques qui ne sont pas exprimés dans le SNC ne seront pas abordés pour nous concentrer sur les transcrits et isoformes cérébrales de tau.

Exons alternatifs 2, 3, 6 et 10

Les exons 2, 3 et 10 sont spécifiques de l'adulte (Andreadis *et al.*, 1992) et leur épissage alternatif produit 6 combinaisons différentes d'ARN messagers : 2-3-10-, 2+3-10-, 2+3+10-, 2+3+10+, 2+3-10+ et 2-3-10+ (Goedert *et al.*, 1989; Andreadis, 2005). L'insertion des exons alternatifs 2 et 3 augmente la taille de la région N-terminale des protéines tau et sont dénommées "2N", "1N" et "0N" selon que les ARNm incluent respectivement les exons 2 et 3, puis l'exon 2 sans l'exon 3 et aucun des exons 2 et 3. L'exon 3 ne peut être inséré dans les transcrits que lorsque l'exon 2 est présent, mais l'addition de l'exon 2 n'entraîne pas l'inclusion systématique de l'exon 3 (Andreadis *et al.*, 1995). Lorsque les ARNm comprennent l'exon 10 qui code un 4^{ème} domaine répété de liaison aux microtubules, les isoformes sont dénommées "4R" pour 4 domaines « Répétés ». Les isoformes excluant l'exon 10 et ne possédant que 3 domaines répétés sont dénommées « isoformes 3R ». La taille des séquences de ces protéines tau varient entre 352 et 441 acides aminés pour une masse moléculaire comprise entre 45 et 65 kDa.

L'inclusion ou l'exclusion des exons alternatifs 2, 3, et 10 définit les 6 transcrits cérébraux classiquement décrits dans le SNC (Andreadis *et al.*, 2005). Cependant, nous savons désormais que les ARNm comportant l'exon 3 ne sont que très rarement exprimés dans le tissu cérébral représentant seulement 10 % des transcrits (Andreadis *et al.*, 2005). De plus l'exon alternatif 6 est également exprimé dans le SNC à des taux similaires voire supérieurs à celui de l'exon 3 (Wei & Andreadis. 1998; Andreadis *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006). Cet exon 6 est exprimé dans le cerveau fœtal, la moelle épinière, le muscle squelettique, mais aussi dans le cervelet et le thalamus. Il posséderait 3 sites alternatifs donneurs d'épissage définissant les exons 6c, 6p et 6d, cependant seul l'exon 6c est décrit dans les bases de données. Les transcrits incluant les exons 6p et 6d aboutissent à l'introduction d'un codon stop, conduisant à une protéine tronquée ne possédant pas de domaine de liaison aux microtubules (Figure 11 B) (Luo *et al.*, 2004).

Considérant la faible expression de l'exon 3 et l'expression encore mal connue de l'exon 6, il apparaît plus juste de parler de 4 isoformes protéiques majeures de protéines tau dans le cerveau (les isoformes 1N4R, 0N4R, 1N3R et 0N3R), associées à différentes isoformes mineures incluant les exons 3 et/ou 6 de *MAPT* (Figure 11 C).

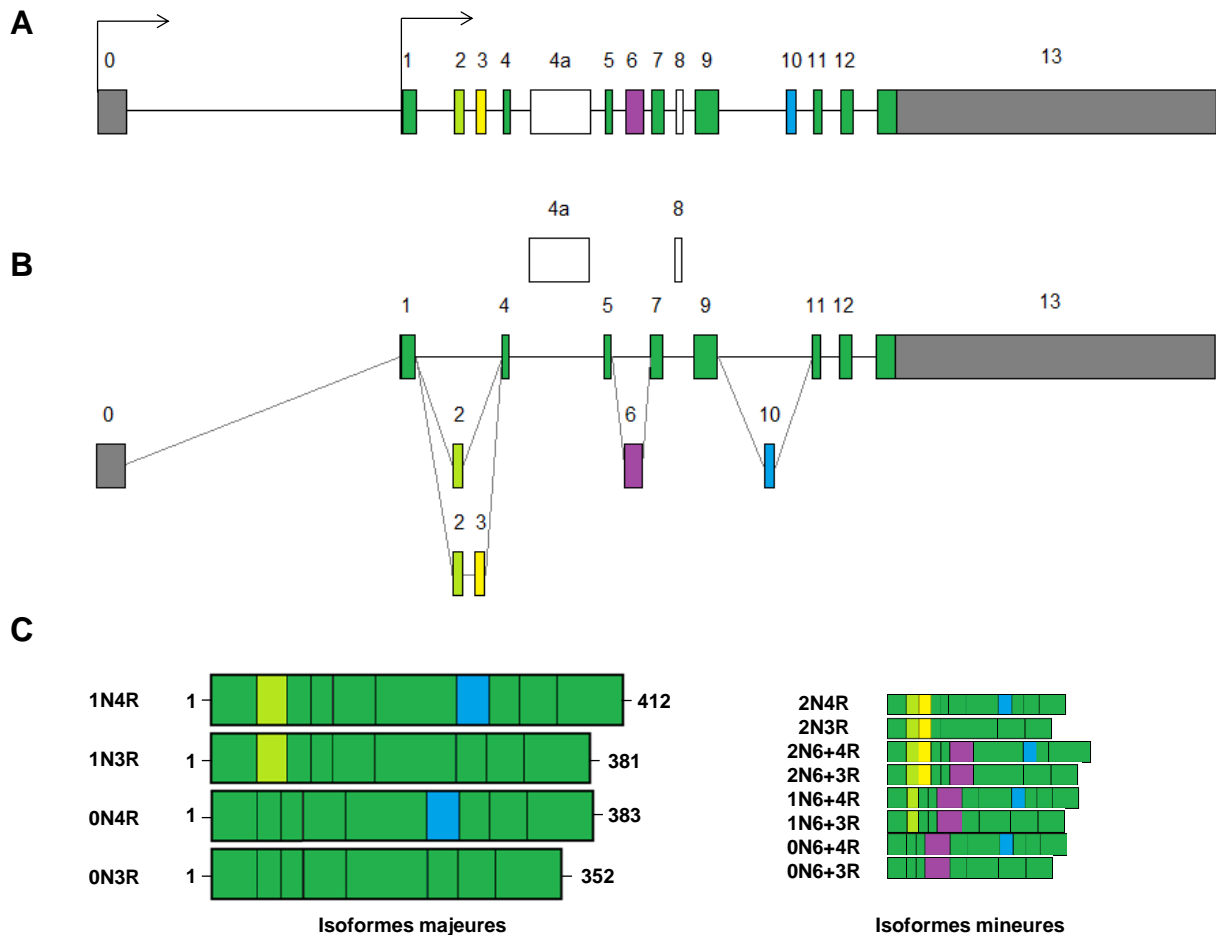


Figure 11 : Représentation schématique du gène *MAPT* et des différents produits du gène exprimés dans le cerveau humain adulte.

A. Structure du gène *MAPT*. Les rectangles représentent les exons et les lignes les introns. Les exons ou parties d'exons colorés en gris ne sont pas traduits en protéines. Les exons colorés en blanc ne sont pas inclus dans les transcrits cérébraux. Les deux principaux sites de débuts de transcription sont représentés par les flèches au début des exons 0 et 1. **B.** Transcrits primaire du gène *MAPT* dans le cerveau. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs. Les exons 2, 3, 6 et 10 subissent un épissage alternatif. Enfin les ARNm peuvent débuter à l'exon 0 ou 1. **C.** Les quatre isoformes majeurs 1N4R, 0N4R, 1N3R et 0N3R des protéines tau et les isoformes cérébrales mineures incluant les exons 3 et/ou 6.

Structure des protéines tau

Les protéines tau sont les constituants majeurs des NFT qui correspondent à une agrégation intracellulaire anormale sous la forme de fibrilles enchevêtrées de protéines tau insolubles anormalement et hyperphosphorylées. Ces filaments pathologiques de protéines tau sont très caractéristiques et portent le nom de PHF (*paired helical filaments*). Ces PHF constituent d'excellents marqueurs ultrastructuraux des processus neurodégénératifs présents dans les tauopathies.

Régions et domaines protéiques

Il est possible de distinguer quatre domaines protéiques dans les protéines tau : la région N-terminale, la région riche en Proline, la région de liaison aux microtubules et la région C-terminale. Pour la description des différentes régions protéiques et domaines, nous considérerons l'isoforme 2N4R de 441 acides aminés, puisqu'elle est la plus grande des 6 isoformes cérébrales initialement décrites et aussi celle dont la structure est la plus étudiée.

La région N-terminale a une longueur variable de 85, 114 ou 143 acides aminés selon l'insertion ou l'exclusion des séquences d'acides aminés codés par les exons alternatifs 2 et 3 du gène *MAPT*. Cette région protéique correspond aux séquences d'acides aminés codés par les exons 1 à 5. Elle est particulièrement riche en acides aminés à chaîne latérale acide (acide aspartique et acide glutamique).

La région riche en proline est codée par l'exon 7 et correspond à la séquence protéique comprenant les acides aminés 144 à 243 de l'isoforme 2N4R. Comme son nom l'indique, cette région protéique comporte beaucoup de prolines (22 %). Cette région protéique est très basique avec un point isoélectrique proche de 10. La région riche en proline permettrait d'espacer les microtubules entre eux et constitue le "domaine de projection" (Chen *et al.*, 1992).

La région de liaison aux microtubules comporte les quatre domaines répétés de liaison aux microtubules. Elle est codée par les exons 9 à 12 et correspond aux acides aminés 244 à 370. Les domaines de liaisons aux microtubules correspondent aux acides aminés 244 à 274, 275 à 305, 306 à 336 et 337 à 368. Ce sont des domaines protéiques de 31 ou 32 acides aminés qui présentent une grande homologie avec la superfamille des MAP (Lewis *et al.*, 1988; Chapin & Bulinski, 1992). Le 2^{ème} domaine correspondant aux acides aminés 275 à 305 est codé par l'exon alternatif 10. L'inclusion de l'exon 10 permet l'insertion d'un 4^{ème} domaine par rapport aux formes dites 3R précédemment évoquées.

La région C-terminale correspond aux acides aminés 371 à 441 codés par l'exon 13. Cette région est globalement acide (point isoélectrique à 6) et est riche en sites de phosphorylation.

Les différents domaines protéiques de l'isoforme 2N4R de 441 acides sont représentés sur la figure 12 A.

Structures primaire et secondaire des protéines tau cérébrales

Les protéines tau contiennent de nombreux acides aminés hydrophiles qui leur confèrent une solubilité élevée. Par exemple, dans le cas de l'isoforme 2N4R, seuls 111 acides aminés sur 441 sont des acides aminés présentant une chaîne latérale hydrophobe (Alanine, Valine, Isoleucine, Leucine, Méthionine, Phénylalanine, Tyrosine ou Tryptophane).

Les protéines tau appartiennent à la classe des protéines intrinsèquement désordonnées également nommée "classe des protéines non repliées à l'état natif". En effet, les protéines tau ne présentent pas de structure secondaire ou tertiaire stable en conditions natives (Mylonas *et al.*, 2008; Mukrasch *et al.*, 2009). Au cours des dernières années, ce type de protéine est apparu comme une fraction majeure du protéome humain avec notamment un rôle dans la signalisation. En effet, les protéines intrinsèquement désordonnées ont une conformation très flexible et sensible aux variations de leur environnement [pour revue : (Dunker *et al.*, 2008)].

Malgré cette absence de structure secondaire à l'état natif, l'étude de leur structure par résonance magnétique nucléaire démontrent que les protéines tau adoptent des structures secondaires transitoires (Mukrasch *et al.*, 2009) (Figure 12 B et C). Il semble également que les protéines tau adoptent différentes structures secondaires lorsqu'elles interagissent avec d'autres protéines comme la tubuline (Kadavath *et al.*, 2015) ou lorsqu'elles subissent des modifications post-traductionnelles du type phosphorylation, acétylation ou troncation (pour revue : Sergeant *et al.*, 2008). Cependant, l'implication des interactions protéiques et des modifications post-traductionnelles des protéines tau dans la survenue de leur agrégation pathologique reste encore mal définie.

A l'état pathologique, les protéines tau vont adopter une structure fibrillaire insoluble sous la forme de PHF, qui résultent d'une conformation anormale des protéines de type feuillet plissé β . Deux séquences peptidiques (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVKY³¹²) localisées au sein des domaines répétés et respectivement codées par les exons 10 et 11 de *MAPT* exerceraient particulièrement un effet fibrillogène dans l'auto-assemblage des protéines tau sous forme de PHF (von Bergen *et al.*, 2000). Ces deux séquences sont également

comprises dans deux structures secondaires transitoires à type de feuillet plissé β au sein de l'isoforme 2N4R de 441 acides aminés (Mukrasch *et al.*, 2009).

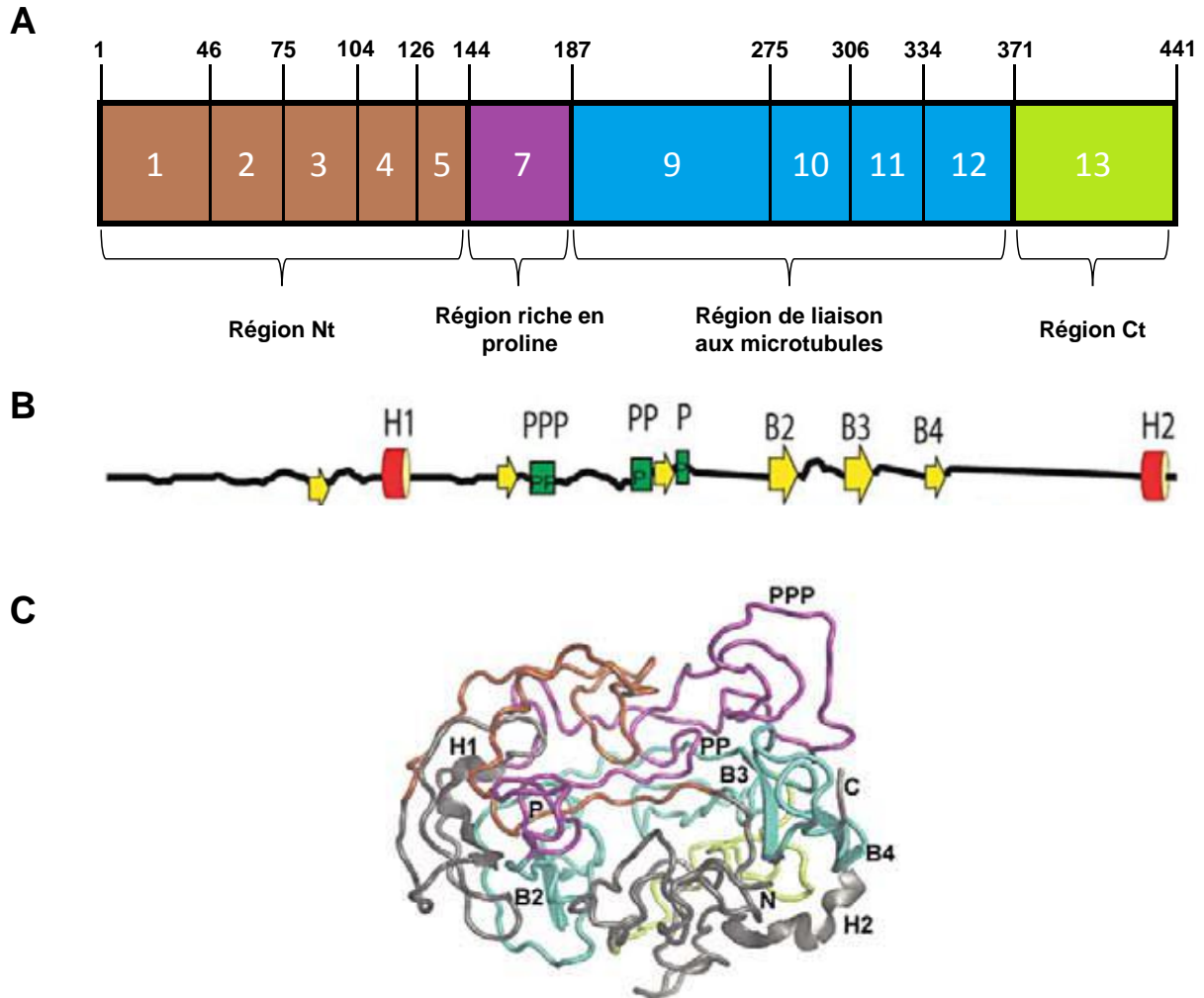


Figure 12 : Conformation native de l'isoforme 2N4R.

A. Organisation par domaines protéiques de l'isoforme 2N4R de protéine tau qui comporte 441 acides aminés. La région N-terminale est colorée en marron, le domaine riche en proline en mauve, la région de liaison aux microtubules en bleu et la région C-terminale en vert. Les séquences protéiques codées par les exons représentées par les rectangles noirs avec le numéro d'exon correspondant. **B.** Représentation schématique des structures secondaires transitoires adoptées par l'isoforme 2N4R. Les cylindres rouges représentent les hélices α , les flèches jaunes les structures en feuillet plissés β et les rectangles verts les stretches de proline. **C.** Exemple d'une représentation de la conformation tridimensionnelle de l'isoforme 2N4R. D'après (Mukrasch *et al.*, 2009).

Les fonctions des protéines tau

Généralités

Les protéines tau appartiennent à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP). Elles sont donc capables de se lier aux microtubules du cytosquelette et ont comme principale fonction de favoriser leur polymérisation et leur stabilité. Elles tirent leur nom de la lettre grecque τ (tau) pour leur capacité à induire *in vitro* la formation des microtubules par l'assemblage des polymères de tubuline (Weingarten *et al.*, 1975). Chez l'Homme, les protéines tau sont abondamment exprimées dans le SNC et plus précisément dans les neurones, où elles se localisent dans différents compartiments cellulaires (soma, dendrites et noyau) mais surtout au niveau axonal (Binder *et al.*, 1985; Dotti *et al.*, 1987). Les protéines tau sont aussi exprimées dans une moindre mesure dans les astrocytes et les oligodendrocytes du SNC, mais aussi dans d'autres tissus comme le SNP, le cœur et les muscles.

Une fonction majeure des protéines tau et la première à avoir été décrite en 1975 est de se lier aux microtubules et d'en réguler la polymérisation. De nombreuses études *in vitro* à partir d'extraits de tissus ou sur des cellules en cultures ont rapportés cette fonction des protéines tau (Weingarten *et al.*, 1975; Drubin & Kirschner, 1986). Cette interaction est possible notamment grâce à la présence de domaines répétés de liaison aux microtubules (Himmler *et al.*, 1989; Ennulat *et al.*, 1989). Ces domaines répétés sont au nombre de 3 ou 4 selon l'inclusion ou non des séquences codées par l'exon 10. Ce 4^{ème} domaine de liaison augmente l'affinité des isoformes 4R de tau pour les microtubules, mais aussi leur vitesse de polymérisation et leur stabilisation (Butner & Kirschner, 1991; Goedert & Jakes, 1990).

Cependant cette capacité de liaison aux microtubules peut être compensée par d'autres MAP comme MAP1A (Harada *et al.*, 1994). C'est pourquoi les souris KO pour le gène *MAPT*, qui code les protéines tau, sont viables, fertiles et ne présentent pas de malformation cérébrale (pour revue : (Ke *et al.*, 2012)). Peu de fonctions dévolues aux protéines tau ont donc pu être validées *in vivo* sur ces modèles de souris transgéniques. La perte de la fonction des protéines tau ne semble pas correspondre au mécanisme physiopathologique principal des tauopathies. Nous ne savons pas si la neurodégénérescence est liée à la perte d'une des fonctions de tau comme le transport axonal, ou si elle est plutôt liée à un gain de fonction toxique des protéines agrégées sous la forme de polymères ou d'oligomères.

Régulation de la stabilité des microtubules

Les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette et sont particulièrement abondants dans les neurones. Ils sont impliqués dans la mitose et le transport cytoplasmique. Cette fonction de transport cytoplasmique est essentielle pour les neurones car les microtubules constituent les rails sur lesquels vont circuler différents composants entre le corps cellulaire des neurones et les prolongements axonaux ou dendritiques.

Comme la plupart des MAP, la liaison des protéines tau avec les microtubules est liée à leur état de phosphorylation. Près de 30 résidus Sérine et Thréonine de tau peuvent être phosphorylés, ce qui fait de la phosphorylation la principale modification post-traductionnelle de tau. Mais il existe d'autres modifications intervenant dans la régulation des protéines tau comme la glycosylation, l'acétylation ou la troncation. Cela souligne la complexité et la variabilité des facteurs influençant la régulation des fonctions de tau. Dans les tauopathies, les protéines tau sont hyperphosphorylées sur des résidus Sérine/Thréonine qui en sont habituellement exempts en conditions physiologiques (pour revue : (Noble *et al.*, 2013)).

En condition pathologique comme dans la MA, les protéines tau ne sont plus capables de se lier aux microtubules et vont présenter alors une localisation cellulaire anormale. De plus, les protéines tau qui sont pourtant hautement solubles vont s'auto-assembler dans les cellules et former les agrégats insolubles. L'agrégation des protéines tau pourrait être responsable d'une perte de leur capacité de liaison aux microtubules.

Transport axonal

Dans les neurones, le transport axonal consiste en une communication à double sens entre le corps cellulaire et les terminaisons axonales. Ce transport axonal est essentiel pour les neurones car il permet l'apport et/ou le recyclage de diverses macromolécules, des mitochondries ou d'autres organites. Dans la mesure où les prolongements axonaux sont parfois situés à une très longue distance du corps cellulaire, ce transport axonal est capital pour la fonction du neurone. Ce transport axonal est essentiel pour les neurones car il permet l'apport et/ou le recyclage des macromolécules, des mitochondries et des nutriments. Dans la mesure où les prolongements axonaux de certains neurones peuvent parfois être situés à près d'un mètre du corps cellulaire, ce transport axonal est réalisé sur de très longues distances à l'échelon d'une cellule. Ce transport intracellulaire consiste principalement en un transport via les microtubules (pour revues : (Hirokawa & Takemura, 2005; Mandelkow *et al.*, 2007)). Les protéines tau interviennent donc indirectement dans le

transport axonal en régulant la stabilité des microtubules et jouent un rôle dans la morphogénèse (croissance neuritique et axonale), le bon fonctionnement et la survie des neurones.

Les protéines tau liées aux microtubules ont aussi la capacité d'agir directement sur le transport axonal en inhibant les mouvements des vésicules mues par les kinésines (Morfini *et al.*, 2007) ou les dynéines (Dixit *et al.*, 2008). Fait intéressant, tau lui-même semble aussi avoir un rôle dans le transport axonal de vésicules contenant le peptide A β (Vossel *et al.*, 2010). Dans différents modèles de cultures cellulaires ou chez des souris transgéniques surexprimant les protéines tau, le transport axonal est perturbé (Ebner *et al.*, 1998; Stamer *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 1999; Ittner, 2008). Mais bien qu'il y ait plusieurs preuves *in vitro* et *in vivo* du rôle direct des protéines tau sur le transport axonal, leurs mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore entièrement élucidés.

Plasticité synaptique

La perte des synapses, leur dysfonctionnement et l'altération de la plasticité synaptique sont de plus en plus impliqués dans la MA (Koffie *et al.*, 2011) (pour revue : (Spires-Jones & Hyman, 2014)). Plusieurs études tendent à montrer que le peptide A β et les protéines tau agissent de concert dans la dégénérescence de synapses (pour revue : (Ittner & Götz, 2011)). Concernant les protéines tau, il a été rapporté que leur accumulation cérébrale corrèle avec la perte synaptique (Ingelsson *et al.*, 2004). De plus, des modèles murins de tauopathies ont aussi observé une perte synaptique (Katsuse *et al.*, 2006). Les mécanismes de la dégénérescence des synapses associés à la pathologie tau sont encore mal compris, mais ils pourraient faire intervenir un défaut de transport des mitochondries au niveau des synapses (Shahpasand *et al.*, 2012).

Les protéines tau ont longtemps été considérées comme exclusivement localisées dans les axones. Mais nous savons désormais qu'elles sont également présentes en faible quantité dans les dendrites où elles jouent un rôle important dans la composition en protéines de la région post-synaptique (Ittner *et al.*, 2010). Tau est capable de favoriser la localisation de la kinase Fyn au niveau de la densité post-synaptique. En l'absence de tau, la kinase Fyn est mal localisée et n'assure plus son rôle de phosphorylation du récepteur NMDA qui joue un rôle essentiel dans la LTP et la plasticité synaptique (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012). Une autre preuve de cette fonction post-synaptique des protéines tau est qu'en exprimant une protéine tau mutée (mutation P301L) dans des neurones en culture, Hoover et collaborateurs ont observé que cette protéine mutante s'accumulait dans les épines dendritiques et était associée à une altération dans la composition en

neurotransmetteurs des synapses ainsi qu'à une altération de la transmission du signal synaptique (Hoover *et al.*, 2010).

Fonctions nucléaires des protéines tau

Les protéines tau ont également été localisées dans le noyau lors d'études menées sur des lignées cellulaires d'origine neuronale (Loomis *et al.*, 1990) et dans le cerveau murin (Violet *et al.*, 2015). Dans le noyau, les protéines tau se localisent au niveau du nucléole, mais elles auraient également la capacité de se lier à l'ADN double brin au niveau des régions du génome riches en dimères répétés d'Adénosine-Thymine (Sjöberg *et al.*, 2006) et l'ARN (Violet *et al.*, 2014). Cette liaison des protéines tau aux acides nucléiques leur conférerait un rôle protecteur des lésions oxydatives des acides nucléiques, notamment durant un stress hyperthermique (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014).

Autres fonctions des protéines tau

D'autres fonctions moins étudiées ont également été dévolues aux protéines tau comme un rôle dans la transduction du signal et la plasticité synaptique (Reynolds *et al.*, 2008), le développement neuronal (Dawson *et al.*, J Cell Sci. 2001) et l'apoptose (Chung *et al.*, 2001). Ces différentes fonctions seraient dépendantes de la localisation intracellulaire des protéines tau. L'ensemble des fonctions de tau sont résumées dans la figure 13.

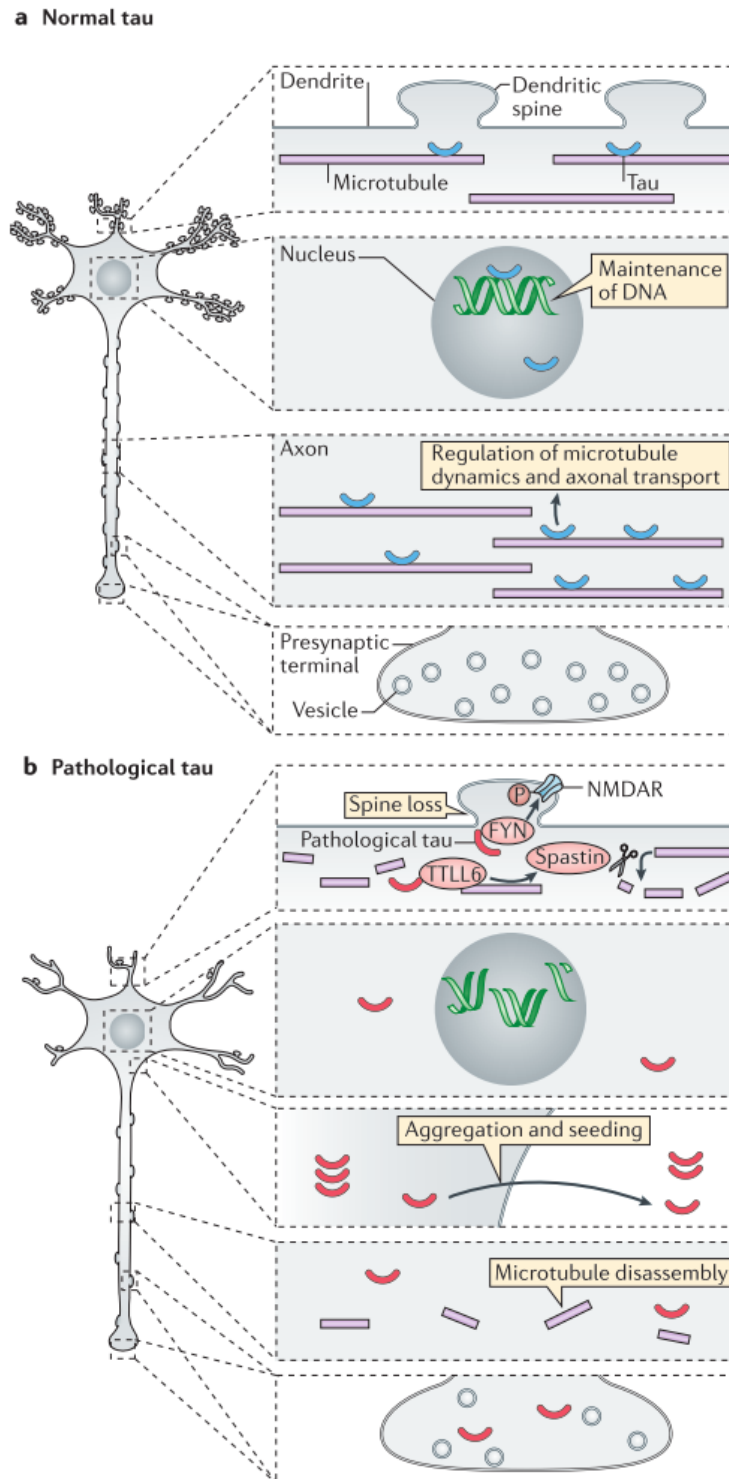


Figure 13 : Différentes fonctions des protéines tau dans les neurones.

A. Fonctions physiologiques des protéines tau dans le neurone en fonction de leurs localisations dans différents compartiments cellulaires. **B.** Dérégulation de ces fonctions en conditions pathologiques avec une diminution du nombre d'épines dendritiques, la perte de fonction protectrice de l'ADN, le désassemblage des rails de microtubule dans les axones et la diminution de vésicules présynaptiques. Enfin, les protéines tau anormales vont également s'agréger et ces agrégats de tau peuvent être libérés dans l'espace extracellulaire et être repris par d'autres neurones, ce qui conduit à la propagation de la pathologie tau (Wang & Mandelkow, 2016).

Chapitre 4 : Physiopathologie des tauopathies

Les facteurs de risques génétiques

Etiologies génétiques des tauopathies

Les étiologies connues des tauopathies sont très hétérogènes avec des origines infectieuses, traumatiques, environnementales/toxiques ou génétiques. Parmi les différentes causes des tauopathies, les étiologies génétiques sont d'un grand intérêt car elles ont permis d'avancer de nouvelles hypothèses dans la physiopathologie des tauopathies. Parmi les 25 tauopathies recensées, 11 sont des maladies génétiques et il est possible de définir au moins un facteur de risque génétique pour six autres (Tableau 5). Cependant, de nombreuses tauopathies n'ont pas d'étiologie bien définie ou présentent une étiologie génétique dans de rares formes familiales qui ne représentent qu'une faible proportion des malades. C'est notamment le cas pour la MA pour laquelle les formes familiales d'origine génétique définies par des mutations des gènes *PSEN1*, *PSEN2* ou *APP* représentent moins de 1 % des patients (Blennow *et al.*, 2006).

L'étude des causes génétiques de la MA et des FTDP-17 s'est révélée particulièrement intéressante pour la compréhension et le débat scientifique portant sur la MA et les tauopathies en général. Ces étiologies génétiques ont ainsi permis d'avancer dans la connaissance de la physiopathologie mais également d'apporter des pistes de recherche pour développer de nouvelles thérapeutiques des tauopathies. En effet, la MA peut être causées par des mutations autosomiques dominantes des gènes *PSEN1*, *PSEN2*, *APP* (Blennow *et al.*, 2006; Ryman *et al.*, 2014) ou par une duplication du gène *APP* (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006). Cette duplication du gène *APP* situé sur le chromosome 21 est par ailleurs la principale hypothèse moléculaire expliquant les démences liées à la trisomie 21. Toutes les mutations de ces gènes aboutissent à une production plus importante du peptide β -amyloïde, l'un des chaînons de la "cascade amyloïde" (Figure 14) comme principale mécanisme physiopathologique de la MA. Selon cette hypothèse, la MA serait causée par l'accumulation de peptide β -amyloïde dont les formes de polymères agrégés ou les formes oligomériques seraient responsables d'une cytotoxicité et d'une inhibition du fonctionnement neuronal. Selon cette hypothèse, l'accumulation de peptide β -amyloïde serait le mécanisme initiateur de la maladie et de l'agrégation de Tau, également observée dans la MA, qui aurait alors plutôt un rôle secondaire en participant à la toxicité neuronale.

Maladie	Cause	Gène(s)	Facteur(s) de risque génétique
Démence frontotemporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17	Maladie monogénique	<i>MAPT</i>	
Démence familiale de type danois	Maladie monogénique	<i>ITM2B</i>	
Démence familiale type britannique	Maladie monogénique	<i>ITM2B</i>	
DLFT (certaines formes causées par des mutations de <i>C9orf72</i>)	Maladie monogénique	<i>C9orf72</i>	
Dystrophie myotonique	Maladie monogénique	<i>DMPK</i> et <i>ZNF9</i>	
Maladie à Prion avec accumulations neurofibrillaires	Maladie monogénique	<i>PRNP</i>	
Maladie de Niemann-Pick de type C	Maladie monogénique	<i>NPC1</i> et <i>NPC2</i>	
Retard mental associé à <i>SLC9A6</i>	Maladie monogénique	<i>SLC9A6</i>	
Gliose sous-corticale progressive familiale	Maladie monogénique	<i>CSF1R</i> <i>PANK2</i>	
Neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer	Maladie monogénique	<i>PLA2G6</i> , <i>C19orf12</i> , <i>FA2H</i> , <i>ATP13A2</i> <i>WDR45</i> , <i>COASY1</i> , <i>FTL</i> , <i>CP</i> et <i>DCAF17</i> <i>?</i>	
Démence liée à la trisomie 21	Chromosomique		<i>APOE</i> (ε4) <i>CR1</i> , <i>BIN1</i> , <i>CLU</i> , <i>PICALM</i> , <i>MS4A4M</i> / <i>MS4A6E</i> , <i>CD2AP</i> , <i>CD33</i> , <i>EPHA1</i> , <i>ABCA7</i> , <i>HLA-DRB5</i> - <i>HLA-DRB1</i> , <i>PTK2B</i> , <i>SORL1</i> , <i>SLC24A4</i> / <i>RIN3</i> , <i>DSG2</i> , <i>ZCWPW1</i> , <i>CELF1</i> , <i>NME8</i> , <i>FERMT2</i> , <i>CASS4</i> , <i>NPP5D</i> et <i>MEF2C</i> <i>MAPT</i> (H1 et H1c) <i>MOBP</i> , <i>STX6</i> et <i>EIF2AK3</i> <i>MAPT</i> (H1 et H1c) <i>MOBP</i> , <i>Inc-KIF13B-1</i> et <i>SOS1</i> <i>MAPT</i> (H1)
Maladie d'Alzheimer	Rares formes monogéniques et multifactorielle	<i>PSEN1</i> , <i>PSEN2</i> et <i>APP</i>	
Paralysie supra-nucléaire progressive	Rares formes monogéniques et multifactorielle	<i>MAPT</i>	
Dégénérescence Corticobasale	Rares formes monogéniques et Âge	<i>MAPT</i>	
Démence à grains argyrophiles	Rares formes monogéniques et Âge	<i>MAPT</i>	
Maladie de Pick	Rares formes monogéniques et ???	<i>MAPT</i> , <i>PSEN1</i>	
Encéphalopathie traumatique chronique ou démence pugilistique	Traumatismes crâniens		<i>APOE</i> (ε4)
Dégénérescences neurofibrillaires diffuses avec calcification	???		
Tauopathie de la substance blanche avec inclusions gliales globulaires	???		
Sclérose latérale amyotrophique avec pathologie neurofibrillaire, non-Guam	???		
Syndrome de l'île de Guam	Environnementale		
Parkinsonisme de Guadeloupe	Age		
Tauopathie primaire liée au vieillissement	Virale		
Syndrome Parkinsonien post-encéphalitique	Virale		
Panencéphalite sclérosante subaiguë	Virale		

Tableau 5 : Les étiologies génétiques des tauopathies.

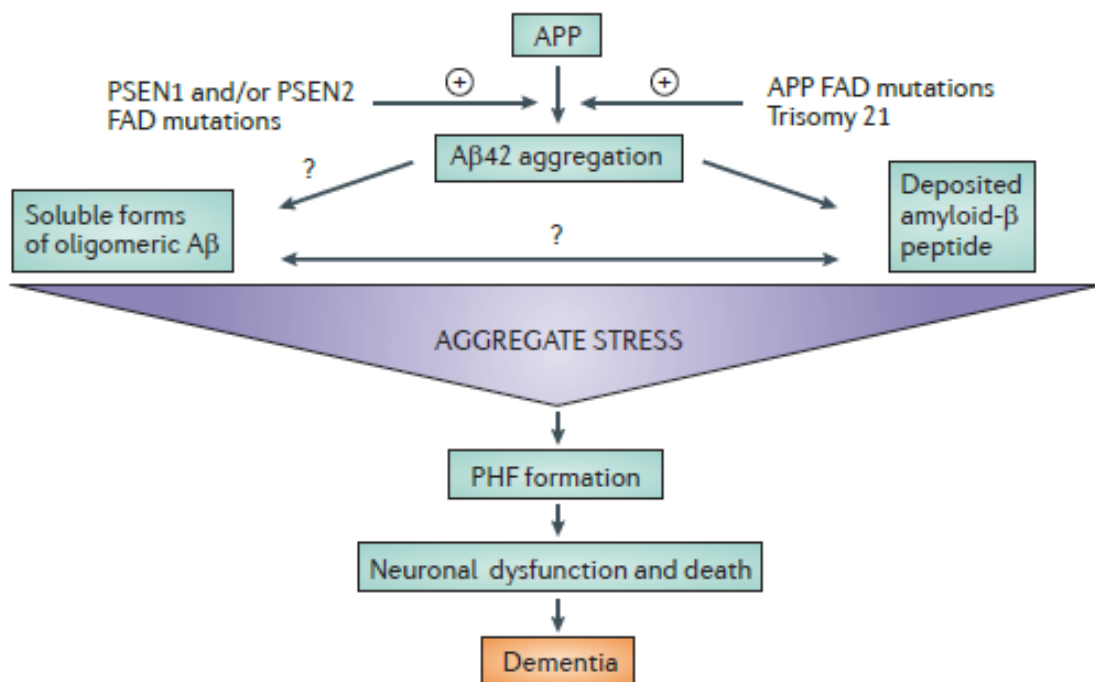


Figure 14 : Hypothèse de la cascade amyloïde.

Selon cette hypothèse, les dépôts de peptide β -amyloïde dans le parenchyme cérébral serait l'étape essentielle conduisant à la MA. L'agrégation de peptide β -amyloïde aboutirait à la formation de dépôts insolubles fibrillaire et de formes oligomériques solubles. Les plus récentes études tendent à incriminer ces formes oligomériques comme étant les formes toxiques de peptides β -amyloïde dans le cerveau. Par la suite, selon des mécanismes encore mal connus, ces formes agrégées de peptide $A\beta_{42}$ aboutirait à l'agrégation des protéines tau sous la forme de *paired helical filament* (PHF). Enfin, ce serait cette agrégation des protéines tau qui serait responsable du dysfonctionnement et de la perte neuronale, menant au syndrome démentiel. Le principal argument de cette hypothèse est que les mutations des 3 gènes *PSEN1*, *PSEN2* et *APP* impliqués dans les formes familiales de MA (FAD) aboutissent à une production plus importante de peptide β -amyloïde ($A\beta_{42}$) (Karran *et al.*, 2011).

Une autre hypothèse propose que les protéines tau serait le principal facteur causal dans la MA. Cette hypothèse se fonde sur le fait que les dépôts de peptide $A\beta$ sous la forme de plaques séniles ne correspondent pas bien à la topographie de la perte de neurones, à l'inverse des dépôts de protéines tau agrégées (Ingelsson *et al.*, 2004). Mais un autre argument fort pour le rôle de tau repose sur l'identification dès 1998 chez de rares tauopathies familiales de mutations du gène *MAPT* (Poorkaj *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998; Dumanchin *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1998). Ces mutations de *MAPT* sont à l'origine de démences fronto-temporales familiales préséniles dénommées FTDP-17 (*Fronto-Temporal Demencia with Parkinsonism linked to chromosome 17*). La majorité de ces mutations sont situées dans les régions codant les domaines de liaison aux microtubules

ou sont des mutations d'épissage qui favorisent l'inclusion ou l'exclusion de l'exon 10 de *MAPT* codant un des domaines de liaison aux microtubules (Figure 15). Les mécanismes pathogènes impliqués dans les FTDP-17 seraient donc liés à l'altération du contenu en isoformes 3R/4R de tau ou à la diminution de la capacité des protéines tau à lier et stabiliser les microtubules. La description de ces mutations de *MAPT* comme responsables des FTDP-17 a démontré que les protéines tau sont directement impliquées dans le processus pathologique conduisant à la neurodégénérescence.

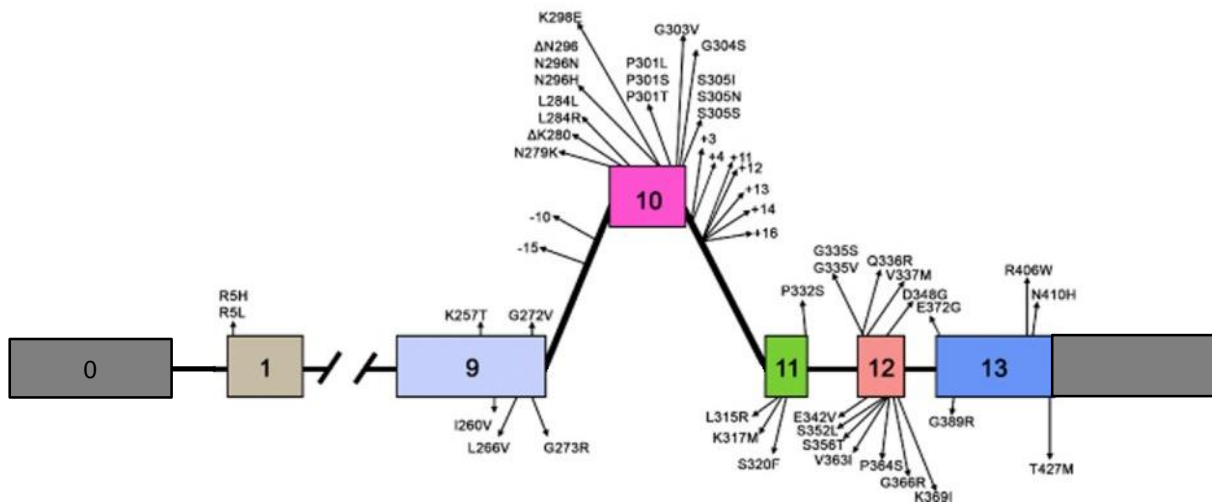


Figure 15 : Répartition des mutations de *MAPT* dans les FTDP-17.

D'après (Ghetti *et al.*, 2015).

Facteurs de susceptibilité génétique

Beaucoup de tauopathies sont des maladies génétiques liées à des mutations d'un gène unique. D'autres maladies, comme la MA, seraient multifactorielles et impliqueraient des variations nucléotidiques dans plusieurs gènes de prédisposition. Des variations des gènes *APOE* et *MAPT* ont été décrites comme associées à des tauopathies. Des variations impliquant d'autres gènes mises en évidence par des études d'association pangénomique ou GWAS (*Genome-Wide Association Study*) possèdent un effet bien plus modeste.

MAPT

MAPT est un autre gène majeur dont des variations polymorphes sont associées à certaines tauopathies. En effet, une inversion polymorphique fréquente de 900 kb englobant le gène *MAPT* divise le locus en deux groupes d'allèles, ou haplotypes dénommés "H1" et

"H2" (Figure 16). L'haplotype H1 est le plus fréquent retrouvé dans la population générale et est significativement plus fréquent chez les patients atteints de PSP, DCB, ou de maladie de Parkinson. Plus précisément, l'allèle A du SNP rs242557 (situé dans l'intron 0 de *MAPT*), définit un sous-haplotype de H1, appelé H1c, qui est fortement associé à la PSP et avec une expression plus importante des ARNm de *MAPT*. Ce sous-haplotype H1c a été décrit comme fortement associé à la PSP et plus significativement que l'haplotype H1 dans une étude portant sur 274 patients atteints de PSP. Dans cette étude, les auteurs ont comparé les génotypes des patients PSP "plus jeunes" (< de 75 ans) et des patients "plus âgés" afin de rechercher une composante génétique associée à leur maladie. Ils ont ainsi pu découvrir le SNP rs242557 fortement associé à la PSP et réduire la région génomique concernée à 22 kb situées dans l'intron 0 de *MAPT* (Rademakers *et al.*, 2005). Dans le cas de la PSP, une récente GWAS (Höglinger *et al.*, 2011) a permis d'estimer que l'haplotype H1 défini dans cette étude par le génotypage du SNP rs8070723 est surreprésenté dans la PSP avec un odds-ratio de 5,46. Un odds-ratio de 3,7 est également observé pour l'haplotype H1 et la DCB (Kouri *et al.*, 2015). Sachant que la majorité des loci identifiés par les GWAS ont rarement un odds-ratio supérieur à 1,2 ; l'haplotype H1 du gène *MAPT* représente un facteur de risque génétique avec un fort impact sur la survenue de ces tauopathies. Plus important encore, l'haplotype H1 très fréquent dans la population générale pourrait se être nécessaire mais non suffisant pour le développement de la PSP (Baker *et al.*, 1999). De nombreuses études ont rapporté un effet de l'haplotype H1 sur l'expression ou l'épissage des ARNm de *MAPT* (Caffrey *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2004). Ces résultats n'ont pas toujours été répliqués et tendent aujourd'hui à impliquer une diminution de l'expression des transcrits de *MAPT* incluant l'exon 3 (Trabzuni *et al.*, 2012). Cependant, le rôle délétère de l'haplotype H1 de *MAPT* reste mal compris à ce jour (Wade-Martins, 2012).

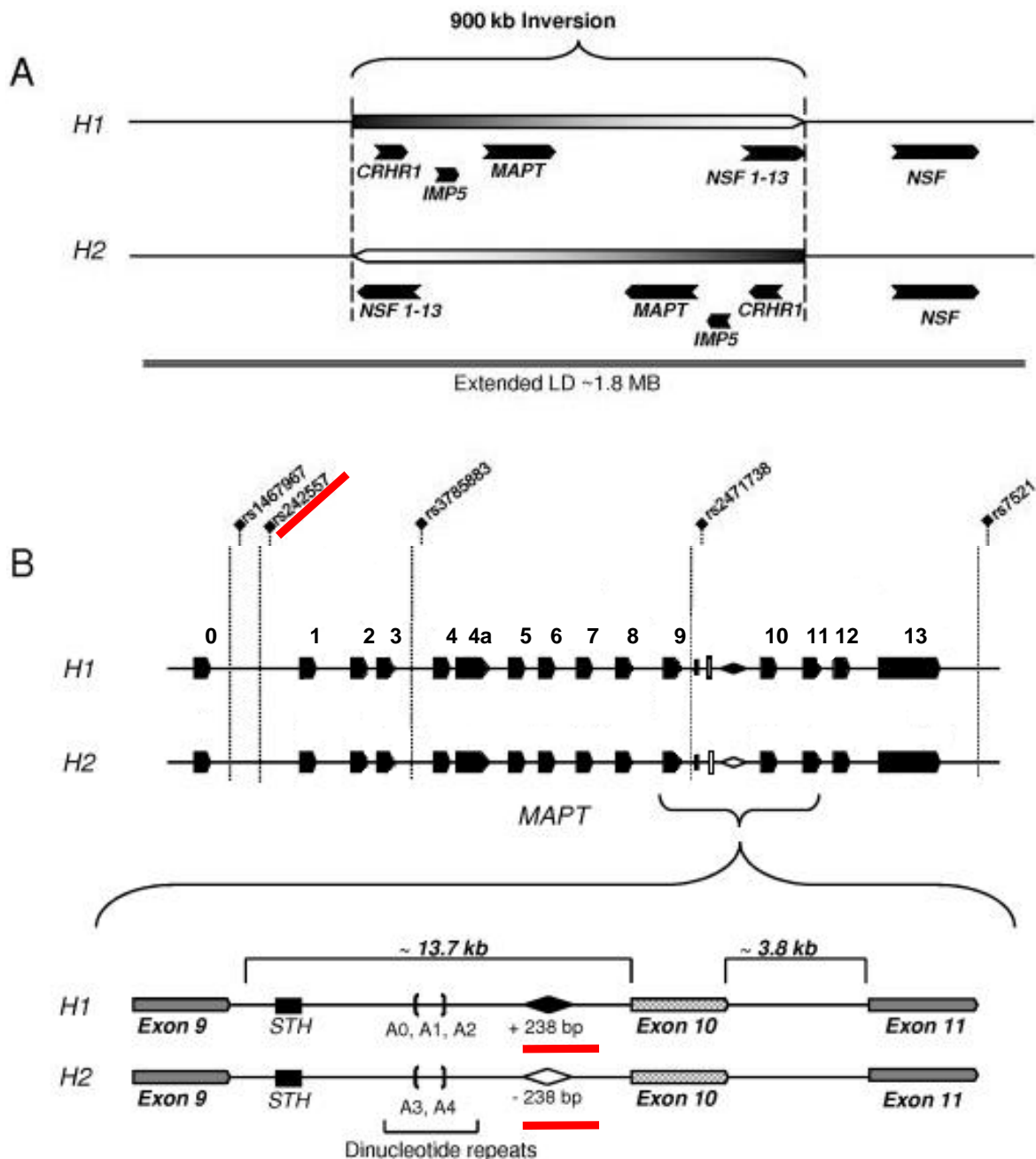


Figure 16 : Haplotypes du locus *MAPT*.

A. Le locus *MAPT* est divisé en deux haplotypes majeurs, H1 et H2. Ce locus est compris dans un grand bloc du chromosome 17 en déséquilibre de liaison et couvrant près de 1,8 Mb. Dans le cas de l'haplotype H2, il y existe une inversion de 900 kb de par rapport à l'haplotype H1. Cette inversion comprend notamment les gènes *MAPT*, *IMP5*, *CRHR1* et *NSF*. **B.** Localisation des principaux marqueurs polymorphiques utilisés dans les études pour définir les haplotypes H1/H2 et les sous-haplotype de H1. L'haplotype H1/H2 a notamment été défini par une répétition de dinucléotide (A0) dans l'intron 9 de *MAPT* chez les patients atteints de PSP (Baker *et al.*, 1999). Les auteurs ont également utilisé d'autres marqueurs génétiques couvrant le locus entier, avec notamment une insertion/délétion polymorphique de 238 pb suppression (+/- 238 pb). Les SNP rs1467967, rs24557, rs3785883, rs2471738, rs7521 ayant permis d'identifier les sous-haplotypes de H1 sont également indiqués (Pittman *et al.*, 2004). Les marqueurs génétiques qui ont été génotypés durant cette thèse d'université sont surlignés en rouge. Figure adaptée d'après (Caffrey & Wade-Martins, 2007).

APOE

Dans le cas de la MA sporadique, de nombreux facteurs de susceptibilité ont été identifiés, mais c'est le variant $\epsilon 4$ du gène *APOE* qui constitue le plus grand facteur de risque génétique (Corder *et al.*, 1993). Ce gène *APOE* code l'apolipoprotéine E, une protéine impliquée dans le transport des lipides et du cholestérol. Deux polymorphismes fréquents sont responsables de changements dans la séquence d'acides aminés et définissent trois allèles distinctes : ApoE2 (cys112, cys158), ApoE3 (cys112, arg158) et ApoE4 (arg112, arg158). Chez les caucasiens, les individus homozygotes pour ApoE4 ont un risque plus important de développer une MA à 75 ans par rapport à des individus possédant un génotype E3/E3 avec un odds-ratio de 14,9. A l'inverse, l'allèle $\epsilon 2$ serait protecteur avec un risque de développer la MA chez les individus de génotype E2/E2 légèrement inférieur aux individus E3/E3 avec un odds-ratio de 0.6 (Farrer *et al.*, 1997). Bien que le mécanisme exact expliquant l'action délétère ou protectrice de ces allèles de *APOE* ne soit pas encore parfaitement élucidé, une de leurs actions seraient de favoriser la protéolyse et la clairance du peptide A β (Jiang *et al.*, 2008).

Autres facteurs génétiques de susceptibilité aux tauopathies

A côté des deux gènes majeurs *APOE* et *MAPT*, d'autres facteurs génétiques fréquents mais avec un faible effet ont été rapportés. Des GWAS ont identifié plus de 20 loci et parmi eux quelques gènes, impliqués dans la MA. Ces gènes sont *APOE*, *SORL1*, *PICALM*, *BIN1* ou *CLU* (Lambert *et al.*, 2013) (pour revue : Reitz & Mayeux, 2014). L'ensemble des gènes associés à la MA qui ont été identifiés par les GWAS sont listés comme facteurs de risque génétiques dans le tableau 5.

Des GWAS se sont intéressées à d'autres tauopathies comme la PSP et la DCB (Höglinger *et al.*, 2011; Kouri *et al.*, 2015) et retrouvent plusieurs loci dont un locus en commun dans les deux maladies correspondant à la région située sur le bras court du chromosome 3 en 3p22 et comprenant le gène *MOBP*. Les gènes retrouvés présentent des odds-ratio de 1,71 pour le gène *MOBP* et 2,41 pour le gène *SOS1*. Le gène *MOBP* (Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein) est exprimé uniquement dans le système nerveux central et particulièrement dans les régions cérébrales touchées par la PSP (Yamamoto *et al.*, 1997). Il pourrait jouer un rôle dans le compactage et/ou la stabilisation de la gaine de myéline. Le gène *SOS1* (Son Of Sevenless Homolog 1) pour sa part code une protéine impliquée dans la transduction du signal en inhibant les protéines Ras et dont le rôle éventuel dans la DCB est moins évident. Au final, les résultats de ces deux GWAS (Höglinger *et al.*, 2011; Kouri *et al.*, 2015) indiquent un chevauchement des facteurs de

risque génétiques de la PSP et de la CDB, mais il semble qu'il existe une variation génétique supplémentaire qui diffère entre les deux troubles.

La description par les GWAS de ces variants génétiques présente un intérêt indéniable pour la compréhension de nouveaux mécanismes pathogéniques des tauopathies. Néanmoins, l'effet de ces variants est très faible et ils ne permettent pas d'expliquer l'ensemble de la composante génétique des maladies complexes comme la MA. Les nombreuses études réalisées et leurs coûts exorbitants n'ont donc pas encore permis de développer de nouveaux traitements efficaces et ont surtout concentré les efforts des chercheurs sur la pathologie amyloïde. Une autre critique importante de ces GWAS est qu'elles ne prennent pas encore en compte les variations génétiques peu fréquentes mais qui pourraient avoir un effet plus important sur la survenue des maladies complexes comme la MA (Figure 17).

Cette limite est désormais dépassée avec le développement des nouvelles technologies de séquençage haut-débit également connues sous l'acronyme de NGS pour *Next-generation sequencing*. En effet, il est possible avec ces nouvelles techniques de séquencer en seulement quelques heures l'ensemble du génome humain sans distinction (analyse de génome) ou de cibler l'ensemble des séquences codantes (analyse de l'exome). De plus, les coûts de séquençage haut-débit ont également chuté ces dernières années permettant l'analyse par NGS d'un nombre élevé d'individus. Dans le cas de la MA, cela a permis d'incriminer de nombreux variants rares du gène *SORL1* en comparant les génomes de 484 patients atteints de MA à 498 témoins (Nicolas *et al.*, 2015). Ce gène *SORL1* (Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats containing) code une protéine limitant la sécrétion du peptide amyloïde. Comme pour les GWAS, il est impossible de déterminer à l'avance si ces nouvelles analyses se révéleront ou non fructueuses pour identifier la part génétique de la MA. Les prochaines années nous apporteront très probablement la réponse et il est important de suivre les résultats de ces analyses de NGS avec attention.

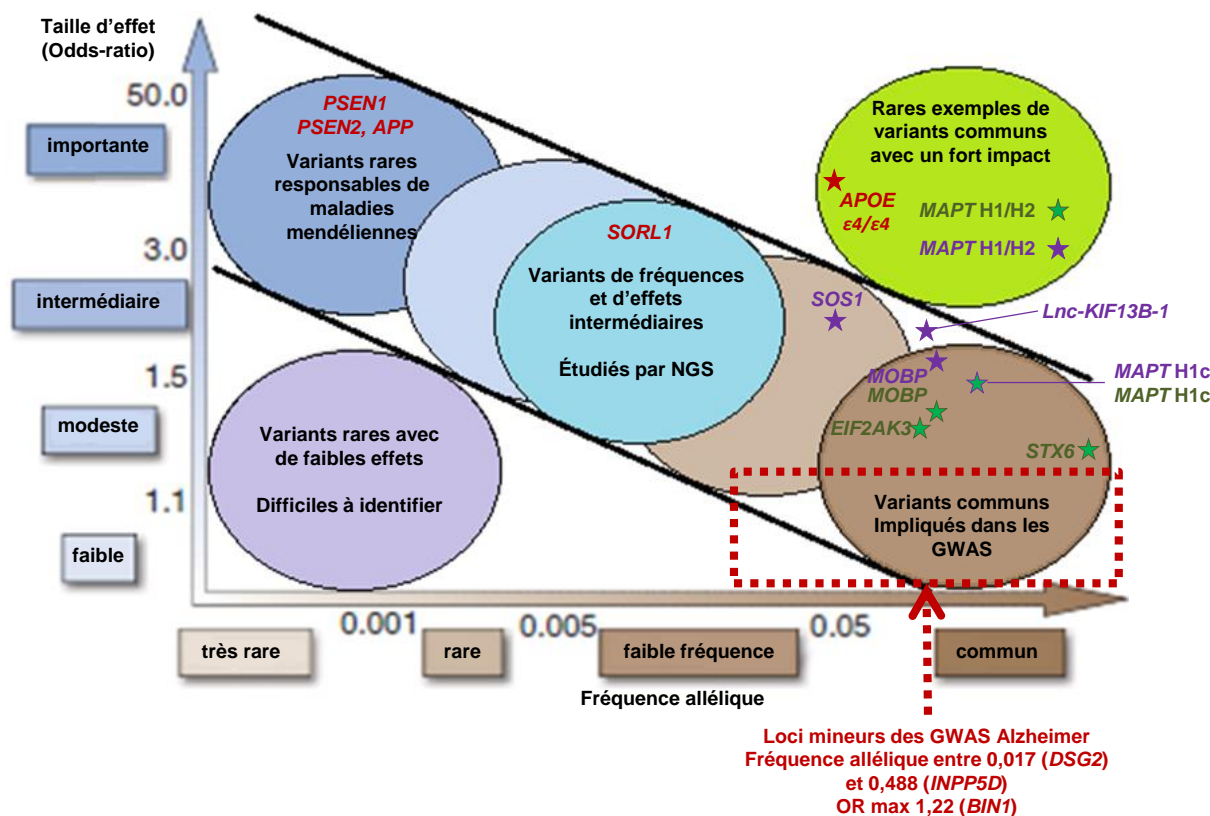


Figure 17 : Variations génétiques et facteurs de susceptibilité aux tauopathies.

Figure résumant les différents facteurs génétiques connus dans les principales tauopathies. Les variations génétiques sont distribuées en fonction de la fréquence allélique de leur allèle mineure (en abscisse) et leur taille d'effet correspondant à l'odds-ratio (en ordonnée). Les étoiles correspondent à la localisation grossière selon leur fréquence allélique et leur odds-ratio des principaux facteurs génétiques de susceptibilité de la MA (en rouge), de la PSP (en vert) et de la DCB (en violet). Les gènes *MAPT* et *APOE* présentent l'intérêt de faire partie des rares facteurs génétiques fréquent et présentant aussi une taille d'effet importante. D'après (Manolio *et al.*, 2009).

Facteurs environnementaux impliqués dans les tauopathies

A l'exception des variants des gènes *APOE* et *MAPT* décrits plus haut et en l'état actuel des connaissances, l'influence du background génétique aurait donc plutôt un rôle mineur dans la survenue des tauopathies sans étiologie déterminée (Ridge *et al.*, 2013). Pourtant la part de la génétique dans la MA avait initialement été suspectée comme bien plus importante. En effet, dans une célèbre étude comparant la fréquence de survenue de la MA chez des jumeaux monozygotes versus des jumeaux dizygotes, les auteurs avaient déterminé que l'héritabilité, soit la part de la génétique dans le développement de cette maladie, était d'un peu moins de 80 %, au détriment des causes environnementales (Gatz *et al.*, 2006). Ces études de jumeaux ne sont toutefois pas dénuées de biais, c'est pourquoi elles sont désormais très controversées (Guo, 2001; Joseph, 2002). De plus en plus

d'études pointent le rôle jusqu'à présent mésestimé de l'environnement et d'autres facteurs liés au mode de vie dans la survenue des maladies neurodégénératives comme la MA (pour revues : (Yegambaram *et al.*, 2015; Chin-Chan *et al.*, 2015)).

Il existe de nombreux facteurs environnementaux, culturels, ou liés au mode de vie qui ont été décrits comme diminuant ou favorisant la survenue des tauopathies. Mais, ces différents facteurs de risque concernent les démences en général et notamment la MA. A noter que, la recherche de facteurs influant ou modifiant ces maladies nécessite d'étudier de grandes cohortes de patients. Il est donc bien plus aisé d'étudier la MA plutôt que d'autres tauopathies ne concernant parfois que quelques dizaines d'individus décrits dans le monde. Il convient donc de considérer avec prudence ces facteurs de risque lorsqu'on étudie une tauopathie particulière. Comme pour les étiologies génétiques rares, tous ces facteurs protecteurs ou de susceptibilité sont autant d'indications pour mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies ainsi que des pistes pour de nouvelles thérapies ou la prévention de ces maladies.

Environnement et MA

Dans le cas de la MA, Xu et collaborateurs ont analysé dans une grande méta-analyse l'ensemble des facteurs de risque non génétiques de la MA et ont identifié 13 facteurs de risque et 23 facteurs protecteurs de la MA décrits chez plus de 5000 individus et qui restaient significatifs après méta-analyse (Figure 18) (Xu *et al.*, 2015). Comme dans le cas des GWAS, les odds-ratio sont faibles puisque inférieurs à 2 pour les facteurs de risque et inférieurs à 0,5 pour les facteurs protecteurs. Cependant, il s'agit bien souvent de comorbidités, d'habitudes alimentaires ou de vie qui sont très répandues dans la population générale comme le tabagisme. De plus, un grand nombre de ces facteurs de risque sont évitables comme le tabagisme, l'IMC élevé en milieu de vie ou le diabète de type II.

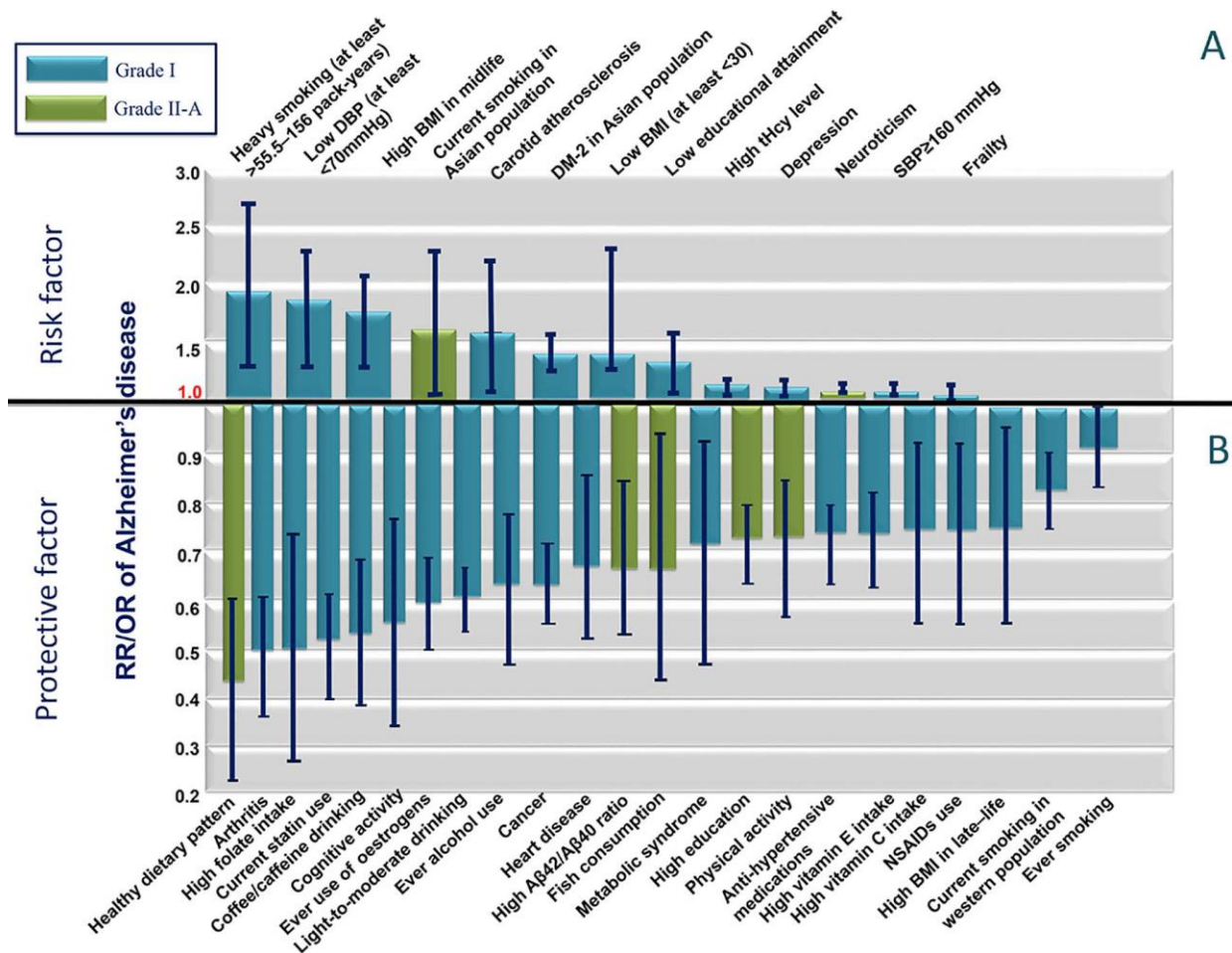


Figure 18 : Différents facteurs de risques environnementaux de la MA.

Différents facteurs environnementaux favorisant (A) ou protégeant (B) de la survenue de la MA. Ces facteurs et leurs risque relatifs / odds-ratio sont issus d'une méta-analyse et portent tous sur plus de 5000 individus malades. La hauteur des histogrammes est représentative de la taille de l'effet. Les lignes noires représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les 29 facteurs de grade I (11 facteurs de risques et 18 facteurs protecteurs) sont définis par une plus faible hétérogénéité entre les différentes études compilées dans la méta-analyse et un plus haut niveau de preuve, par rapport aux 7 facteurs de grade II-A (2 facteurs de risques et 58 facteurs protecteurs) (Xu *et al.*, 2015).

Environnement et PSP

Dans le cas de la PSP, le bas niveau d'éducation serait un facteur de risque comme dans la MA (Golbe *et al.*, 1996). Il faut noter aussi l'existence de concentrations anormales de patients atteints de tauopathies dans certaines régions très délimitées. Ce fut notamment le cas pour le syndrome de l'île de Guam (Elizan *et al.*, 1966) et le parkinsonisme de Guadeloupe (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002). Les hypothèses pour cette apparition de nombreux cas de tauopathies, dans ces isolats géographiques a fait évoquer l'exposition à différents facteurs environnementaux. Par exemple, dans le cas du parkinsonisme de Guadeloupe, ont été incriminées des neurotoxines présentes dans certaines plantes

tropicales (le corossol) qui auraient comme cible d'inhiber la chaîne respiratoire des mitochondries (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002).

Interaction entre génétique et environnement

Le rôle de l'environnement en tant que facteur causal ou facteur de risque a gagné en importance dans le cas de nombreuses pathologies multifactorielles comme les maladies neurodégénératives. Mais facteurs environnementaux et génétiques ne doivent pas être considérés séparément comme deux grands mécanismes indépendants. En effet, il existe de nombreux cas d'interactions génétique-environnement. Par exemple, des mutations du gène *G6PD* sont responsables d'un déficit en enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase. Ce déficit aboutit à des épisodes d'hémolyse intravasculaire aiguë en cas de consommation de fèves qui contiennent des substances oxydantes. Cette maladie génétique, parfois appelée "favisme", est un exemple de contribution entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux dans le développement d'une maladie. Un autre exemple d'interaction entre les gènes et l'environnement consiste en les modifications épigénomiques qui vont réguler l'expression génique en fonction des variations de l'environnement et permettre à la cellule de s'adapter aux changements de son environnement.

Régulation de l'expression des gènes par les promoteurs alternatifs

Les promoteurs alternatifs et l'utilisation de différents sites alternatifs d'initiation de la transcription sont des mécanismes fréquents dans le génome animal qui contribuent largement à la diversité du transcriptome et du protéome. En effet, Kimura et collaborateurs ont démontré en analysant les ARNm issus de 14 628 gènes humains codants que plus de 52 % de ces gènes possédaient un ou plusieurs promoteurs alternatifs, avec une moyenne de 3,1 promoteurs alternatifs par gène (Kimura *et al.*, 2006). Dans le cerveau en particulier, l'utilisation des promoteurs alternatifs est un mécanisme de régulation génique fréquemment utilisé et qui permet d'expliquer les différences d'expression entre les régions cérébrales chez les sujets âgés (Pardo *et al.*, 2013).

Mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les promoteurs alternatifs

Les promoteurs alternatifs peuvent réguler l'expression des différents transcrits d'un même gène par différents mécanismes : les régulations de l'expression, de l'épissage, de la diversité des séquences codantes ou non codantes. Ces différents mécanismes n'étant pas exclusifs les uns des autres. L'ensemble des conséquences des promoteurs alternatifs est résumée dans la figure 19 (pour revue : (Landry *et al.*, 2003)).

Régulation de l'expression

Si un gène possède deux ou plusieurs promoteurs alternatifs, alors chacun d'entre eux doit posséder des séquences régulatrices spécifiques capables de fixer différents facteurs de transcription. Ces deux promoteurs peuvent donc alors avoir différents niveaux d'efficacité de transcription. De plus, ils peuvent aussi s'exprimer dans différents types cellulaires et répondre à différents stimuli. Ensuite, certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'utilisation de ces promoteurs alternatifs pourrait aussi diminuer l'activité du promoteur constitutif (pour revue : Kulis *et al.*, 2013).

Diversité des séquences non codantes

L'utilisation d'un promoteur alternatif peut également aboutir à la synthèse de transcrits présentant des séquences non codantes différentes ou tronquées (Figure 19.1.i et ii). Or les régions 5'UTR sont essentielles à la stabilité des ARNm, leur transport dans les différents compartiments cellulaires et l'efficacité de la traduction.

Diversité des séquences codantes

Pour certains gènes, l'utilisation d'un site alternatif de début de transcription peut conduire à la traduction de protéines possédant différentes séquences codantes N-terminales (Figure 19.2.i) tandis que d'autres peuvent conduire à des isoformes protéiques tronquées pour la région N-terminale (Figure 19.2.ii, iii et iv). Les altérations de l'épissage liées à l'utilisation des promoteurs alternatifs jouent également sur les séquences codantes. L'utilisation de promoteurs alternatifs peut aussi aboutir à des transcrits traduits dans différents cadres de lecture et codant donc pour des protéines très différentes (Figure 19.2.v et vi).

Régulation de l'épissage alternatif

En débutant à différents exons, le contenu en exons des transcrits est forcément modifié. Mais il est également possible que l'utilisation d'un autre promoteur change l'épissage alternatif des transcrits pour favoriser l'inclusion ou l'exclusion de certains exons alternatifs. Cela peut résulter en l'utilisation d'un ORF alternatif et à la synthèse de protéines très différentes (Figure 19.b.vi). Certains exons alternatifs pourraient aussi voir leur épissage altéré (Figure 19.c). Un modèle possible permettant d'expliquer ce phénomène pourrait être que l'utilisation d'un promoteur alternatif avec une efficacité de transcription plus importante ne laisserait pas assez de temps à la machinerie du spliceosome pour inclure ou exclure certains exons (pour revue : Montes *et al.*, 2012)). Selon ce modèle, l'efficacité d'expression pourrait donc influencer sur l'épissage alternatif des gènes.

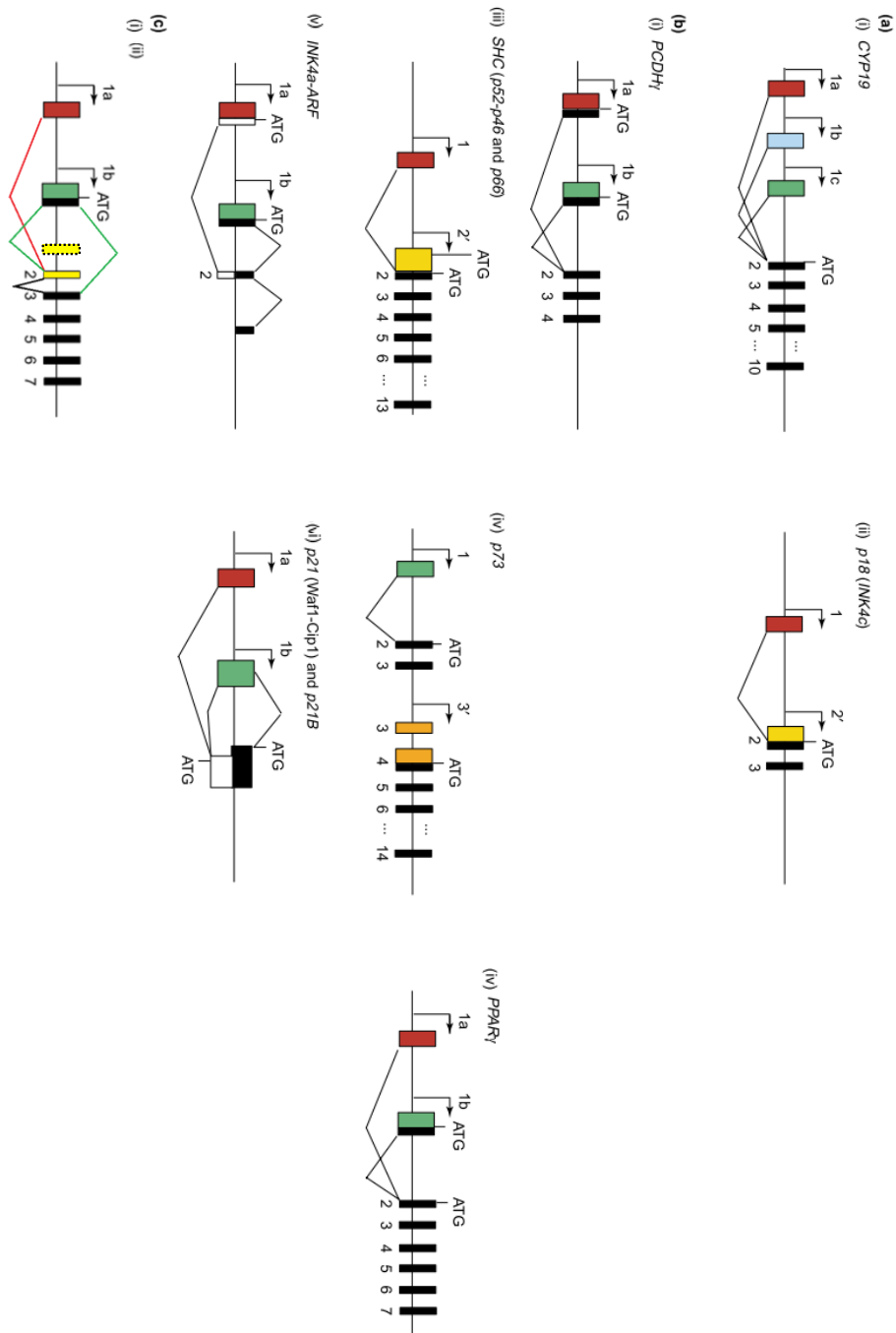


Figure 19 : Différents types de promoteurs alternatifs et leurs conséquences.

A. Diversité des séquences non codantes. L'usage de promoteurs alternatifs (représentés par des flèches) ne donne pas lieu à différentes isoformes protéiques puisque les premiers exons en 5' sont non codants et reliés à un second exon commun qui contient le site d'initiation de la traduction, représentée par un ATG. Les boîtes noires illustrent exons codants et les introns par les lignes horizontales. **B.** Diversité des séquences codantes. L'utilisation de plusieurs promoteurs produit des ARNm qui codent pour des isoformes protéiques se différenciant par leur extrémité N-terminale. Cette extrémité peut être totalement différente (i) ou être partiellement tronquée (ii, iii et iv). L'utilisation de promoteurs alternatifs peut aussi aboutir à des transcrits traduits dans différents cadres de lecture (représentés par les boîtes noires et blanches) et codant donc pour des protéines très différentes (v et vi). **C.** Epissage alternatif. L'utilisation du promoteur alternatif 1b aboutit à l'épissage alternatif de l'exon 2 (en jaune).

Promoteurs alternatifs de MAPT

La littérature ne définit qu'un seul promoteur au gène *MAPT* en 5' de l'exon 0. Pourtant, la base de données de transcrits Genbank et la base Ensembl qui compile les expériences issues du projet Gencode (Harrow *et al.*, 2006) décrivent plusieurs transcrits du gène *MAPT* débutant à différents sites de l'exon 0. Ces transcrits vont ainsi débuter au premier nucléotide en 5' jusqu'au nucléotide 291 parmi les 305 que comporte l'exon 0. Plus intéressant encore, ces bases de données rapportent également cinq ARNm codants pour des protéines tau et débutant au niveau de l'exon 1, lequel est pourtant situé à environ 68 kb de l'exon 0. Au total, il existe au moins 5 exons en plus de l'exon 0 (plus précisément les exons 1, 2, 3, 4a_{Long} et 5) qui ont été identifiés comme étant les premiers exons de différents transcrits du gène *MAPT* (Figure 20).

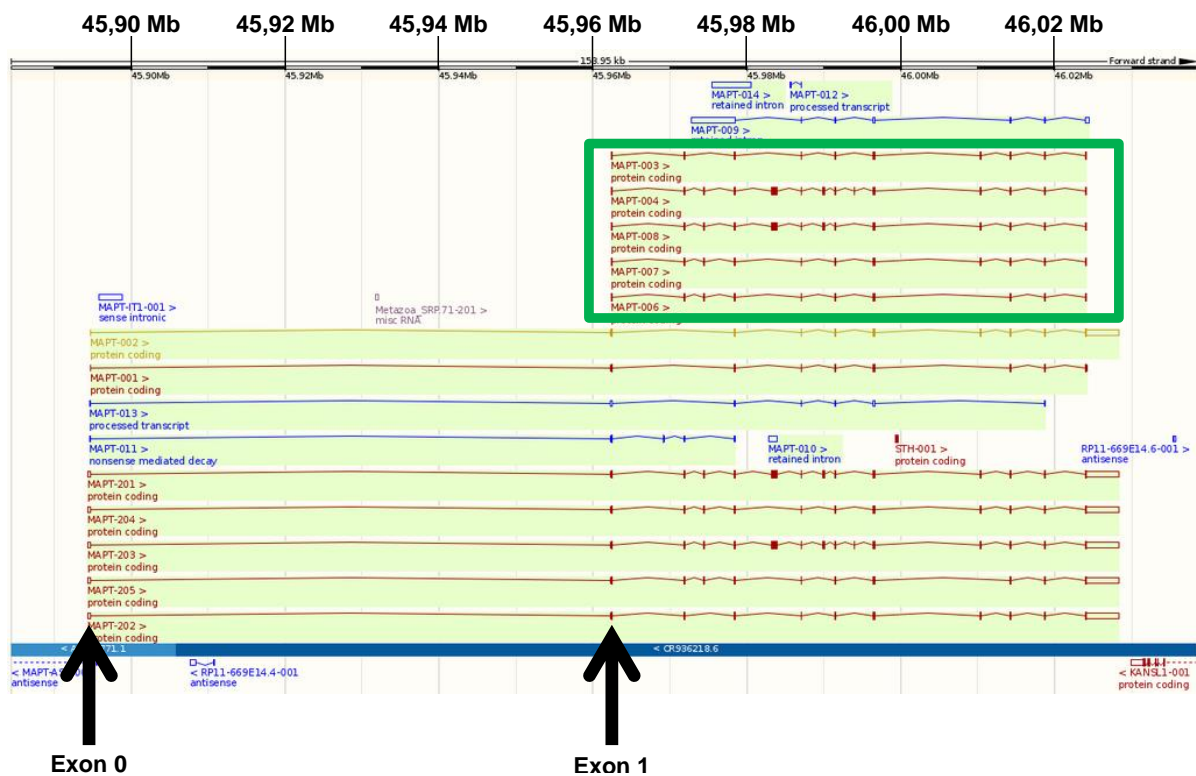


Figure 20 : Les transcrits de *MAPT*.

Différents transcrits du gène *MAPT* répertoriées dans la base de données Ensembl. Les transcrits traduits en protéines sont colorés en rouge ou en orange. Les transcrits colorés en bleus ne sont pas codant et/ou sont susceptibles de subir une destruction par *nonsense-mediated decay*. Les exons sont représentés par des rectangles et les introns par les lignes horizontales. Les portions de rectangles non colorés représentent les séquences non codantes des transcrits. Les exons 0 et 1 sont signalés par les flèches noires. Les transcrits débutant par l'exon 1 sont entourés en vert. La localisation sur le chromosome 17 est notée en Mb selon la version GRCh38.p7 du génome humain. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000186868;r=17:45894382-46028334).

L'existence de différents sites alternatifs situés à de si grandes distances du site habituel d'initiation de la transcription est évocatrice de la présence d'au moins un promoteur alternatif du gène *MAPT*. A notre connaissance, les promoteurs alternatifs de *MAPT* n'ont pas encore été identifiés ni même étudiés. Nous ne savons donc pas comment ces promoteurs additionnels régulent les nombreux transcrits de *MAPT*, ni si ces promoteurs exercent ou pas un rôle dans la survenue des tauopathies. Dans ce cas, il est envisageable que l'un de ces promoteurs soit inactivé ou réactivé dans le cerveau des patients atteints de tauopathies. De plus, les transcrits de *MAPT* ayant l'exon 1 comme site de début de transcription sont susceptibles d'être traduits en protéines. En effet, l'exon 0 étant complètement non codant, son exclusion permet de respecter le cadre de lecture.

Régulation de l'expression des gènes par les modifications épigénomiques

Définition

Les modifications épigénomiques correspondent à l'ensemble des modifications réversibles de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones. Quelques exemples de modifications épigénomiques sont la méthylation et l'hydroxyméthylation des cytosines ou encore l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3. Toutes les modifications épigénomiques influent sur l'état de compaction de la chromatine et contribuent à la régulation de l'expression génique. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont précisé les différentes modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage des nucléosomes, ou encore le contrôle de la structure de la chromatine par les ARN non codants (pour revues : (Rothbart & Strahl, 2014; Schwartz & Pirrotta, 2013; Holoch & Moazed, 2015; Marchese & Huarte, 2014)). Toutefois nous commençons seulement à comprendre les interactions complexes qui existent entre les différentes modifications épigénétiques.

L'épigénétique est un processus dynamique et réversible qui peut être modifié par de nombreux facteurs génétiques ou environnementaux. L'épigénétique est impliquée dans un nombre croissant de mécanismes physiologiques comme le développement et la différenciation cellulaire (Cui *et al.*, 2009; Colaneri *et al.*, 2013; Doi *et al.*, 2009), mais aussi dans un grand nombre de maladies comme les cancers (Baylin & Bestor, 2002) ou certaines maladies psychiatriques comme la schizophrénie ou le trouble bipolaire (Carrard *et al.*, 2011). De plus l'épigénétique est aussi un domaine émergent dans la recherche sur le vieillissement (Horvath, 2013) et les maladies neurodégénératives (pour revue : (Jakovcevski & Akbarian, 2012)).

Au cours de cette thèse, nous ne nous sommes intéressés qu'à la méthylation de l'ADN en raison de son rôle prépondérant dans la régulation de l'expression génique, pour sa stabilité dans les tissus postmortem (Rhein *et al.*, 2015; Llamas *et al.*, 2012). C'est pourquoi, nous nous concentrerons par la suite sur la méthylation de l'ADN.

Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un résidu méthyle sur le carbone en position 5 des cytosines par un enzyme de type DNA methyl-transférase (DNMT). Cette méthylation des cytosines ne concerne que certaines cytosines du génome notamment lorsqu'elles sont suivies par une guanine. Ce dinucléotide "Cytosine-Guanine" est le principal

site de méthylation de l'ADN et est dénommé CpG. La méthylation de l'ADN joue un rôle prépondérant dans la modulation de l'expression génique. Cette observation a été le plus souvent liée à la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG (CGI), des régions du génome qui sont très denses en sites CpG et le plus souvent dans la partie proximale des régions promotrices des gènes. Il existe une relation inverse entre le taux de méthylation de l'ADN au niveau des CGI et l'expression des gènes proches de ces îlots. Une hyperméthylation des CGI est liée à l'inactivation des gènes, tandis que leur hypométhylation s'accompagne d'un état relâché de la chromatine et permet l'expression génique (pour revue : Jones & Baylin, 2002)). La méthylation des CGI permet le recrutement de protéines se liant à l'ADN méthylé et portant le nom de *Methyl-CpG-Binding Domain Protein* (Protéines MBD). Ces protéines MBD vont recruter des histones désacétylases, des histones méthyltransférase répressives et d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Ces complexes protéiques vont ainsi induire la compaction de la chromatine et la répression de la transcription (Figure 21) (pour revue : (Klose & Bird, 2006)).

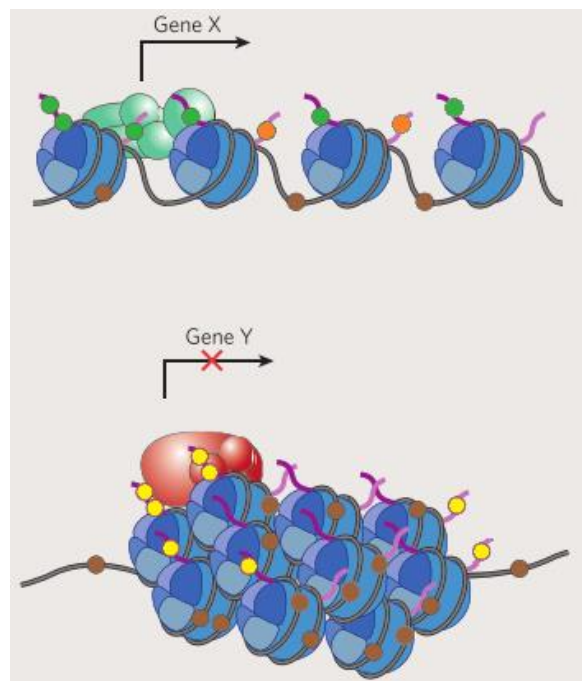


Figure 21 : Méthylation de l'ADN et transcription.

Le gène X (en haut) est un actif sur le plan transcriptionnel avec une méthylation de l'ADN clairsemée (disques bruns), une structure ouverte de la chromatine, l'interaction avec les protéines se liant à l'euchromatine (complexe protéique vert) et des modifications des histones à type de acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9Ac = disques verts) et la méthylation de lysine 4 de l'histone H3 (H3K4Me = disques oranges). Le gène Y (en bas) est inactif sur le plan transcriptionnel avec une méthylation de l'ADN dense, une structure fermée de la chromatine, l'interaction avec des protéines se liant à l'hétérochromatine (complexe protéique rouge) et les modifications des histones telles que la méthylation de lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Me = disques jaunes). D'après (Feinberg, 2007).

Cette régulation de la transcription ne se produit pas seulement au niveau des CGI, mais aussi dans les régions génomiques proches, appelées rivages des îlots CpG (CGI shores). Ces régions sont supposées être responsables de la majeure partie de la méthylation de l'ADN tissu-spécifique (Doi *et al.*, 2009). Plus récemment, d'autres fonctions de la méthylation de l'ADN au niveau des régions intragéniques ont été décrites. En effet, elle est impliquée dans l'épissage alternatif (Shukla *et al.*, 2011) et l'utilisation de promoteurs alternatifs (Figure 22) (Cheong *et al.*, 2006).

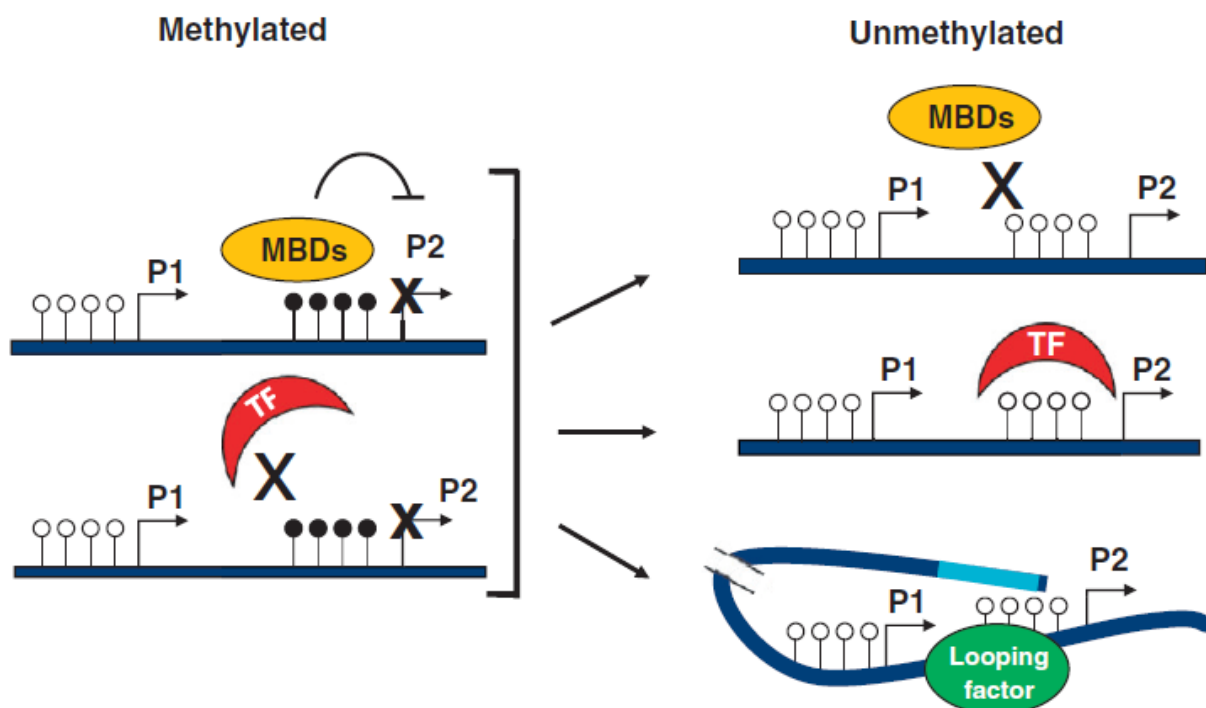


Figure 22 : Méthylation de l'ADN et promoteurs alternatifs.

La méthylation du promoteur alternatif P2 (à gauche) peut aboutir à l'inactivation (*silencing*) du promoteur par le recrutement de protéines MBD et/ou par l'inhibition de la fixation de facteurs de transcription (TF). A l'inverse, la déméthylation du promoteur alternatif P2 (à droite) peut aboutir à l'activation de ce promoteur par la libération des protéines MBD, ce qui facilite la liaison de facteurs de transcription et/ou la formation d'une boucle de l'ADN mettant en rapport le promoteur P2 avec un enhancer distal (représenté en bleu clair). La transcription à partir du promoteur P1 peut être soit inchangé, soit diminuée (non représenté) lors de l'expression à partir du promoteur. Les promoteurs P1 et P2 sont représentés par les deux flèches. Les CpG méthylés et déméthylés sont représentés respectivement par les disques blanc et noirs alternatif (Kulis *et al.*, 2013).

Méthylation de l'ADN et cerveau

Les profils de méthylation de l'ADN sont hautement spécifiques des tissus et des types cellulaires. Ceci est encore plus sensible pour le cerveau qui présente un taux élevé

de méthylation des CGI shores par rapport aux autres tissus, mais aussi des variations de méthylation selon les aires cérébrales (Quon *et al.*, 2013). La méthylation de l'ADN joue un rôle dans la formation et l'apprentissage de la mémoire à long terme. Elle a été impliquée dans la réparation du système nerveux central (Iskandar *et al.*, 2010), dans la survie des neurones (Fan *et al.*, 2001), dans la plasticité synaptique et la mémoire (Feng *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2008). Une déméthylation de l'ADN est également induite par l'apprentissage ce qui suggère que l'interaction entre les deux processus influence les fonctions cognitives (Lubin *et al.*, 2008).

Méthylation de l'ADN et génétique

Les variations de la séquence génétique ont été impliquées comme des déterminants importants des variations épigénomiques et de l'expression génique. Par exemple, les SNP peuvent changer les sites CpGs et ainsi empêcher la méthylation de ces CpGs et des loci voisins (Shoemaker *et al.*, 2010). Plusieurs études ont permis d'identifier une corrélation entre des variations génétiques du génome humain, la méthylation d'ADN et l'expression génique (Gibbs *et al.*, 2010; Hellman & Chess, 2010). Ces variations génétiques influant sur la méthylation de l'ADN des loci proches (variations génétiques *en cis*) contribuent à expliquer la part de la génétique (c'est à dire l'héritabilité) dans la variabilité du transcriptome humain, notamment dans le cerveau (Quon *et al.*, 2013).

Un des exemples de ces variations polymorphiques influant la méthylation de l'ADN consiste en les haplotypes H1/H2 du gène *MAPT*. En effet, Coupland et collaborateurs ont observé une association entre les diplotypes H1/H1, H1/H2, H2/H2 et le taux de méthylation au niveau du promoteur en 5' de l'exon 0 du gène *MAPT*. Dans cette étude réalisée sur des échantillons sanguins et cérébraux de patients atteints de maladie de Parkinson, les individus porteurs du diplotype H1/H1 présentent des taux de méthylation plus élevés. De plus, les taux de méthylation du promoteur de *MAPT* (Coupland *et al.*, 2013). Dans une autre étude étudiant la méthylation de l'ADN de l'ensemble du génome dans le sang de témoins et de patients atteints de PSP ou de DLFT, Li et collaborateurs ont également observé une relation entre haplotype H1 et taux de méthylation du locus 17q21.31 comprenant le gène *MAPT*. De plus, l'augmentation du risque de développer une PSP chez les individus possédant l'haplotype H1 serait liée à la méthylation différentielle à ce locus (Li *et al.*, 2014).

Méthylation de l'ADN et âge

L'âge est le facteur de risque majeur de la majorité des tauopathies notamment la MA dont l'incidence augmente très vite après 60 ans (Kawas *et al.*, 2000). Mais cet état de fait se heurte à notre faible connaissance des mécanismes du vieillissement cérébral normal. Il est par exemple difficile de déterminer si la MA doit être considérée comme une maladie distincte du vieillissement cérébral normal ou si elle constitue la dernière étape d'une forme de vieillissement cérébral inéluctable à l'homme qui atteint un âge avancé (Fjell *et al.*, 2014).

Le vieillissement s'accompagne d'une diminution globale de méthylation de l'ADN. Cette réduction de méthylation avec l'âge a été liée à l'inefficacité progressive de DNMT1 de maintenir le statut hyperméthylé de l'ADN sous forme d'hétérochromatine au cours du vieillissement (Fraga *et al.*, 2007). Ces variations de méthylation de l'ADN avec le vieillissement ont également été observées dans les cellules cérébrales (Hernandez *et al.*, 2011). Cependant ces variations épigénétiques liées l'âge ne sont pas uniformes selon leur localisation. Par exemple, les îlots CpG semblent plus méthylés avec l'âge, tandis que les CGI shores deviennent hypométhylés (Christensen *et al.*, 2009).

Méthylation de l'ADN et environnement

L'épigénétique permet aux cellules d'adapter leur comportement en fonction des variations de leur environnement. Cela permet aux cellules de répondre à des stimuli externes, liés au milieu physique ou chimique, au stress, aux interactions sociales; ou à des stimuli internes comme les signaux hormonaux ou l'alimentation. Les variations de l'environnement peuvent donc influencer sur l'épigénome et aboutir à différentes pathologies. Par exemple, les hormones oestrogéniques et les toxiques de l'environnement comme certains pesticides ou plastiques qui miment l'action de ces hormones ont la capacité de modifier la méthylation de l'ADN et sont responsables de troubles de la fertilité (Anway *et al.*, 2005). Les toxines environnementales telles que l'arsenic ou les métaux lourds perturbent la méthylation de l'ADN et la compaction de la chromatine (Sutherland *et al.*, 2003). Enfin, un régime pauvre en folates pourrait également être responsable de l'apparition de pathologies liées à des altérations de l'épigénome. En effet, les réactions biochimiques de méthylation de l'ADN et des histones nécessitent l'utilisation de groupements donneurs de méthyles apportés par les folates (acide folique, B12, B6) présents dans l'alimentation ainsi que d'autres composés comme la bétaine et des coactivateurs enzymatiques comme la vitamine B2 et le zinc. Lors de ces réactions enzymatiques, les groupements méthyles apportés par les folates sont transférés sur l'homocystéine ce qui permet la synthèse de méthionine. Par la suite, la méthionine subit l'action de la S-adénosyl-méthionine synthétase afin de produire

la S-adénosyl-méthionine (SAM) qui est la molécule donneuse de méthyles de l'organisme. Enfin la SAM est transformée en S-adénosyl-homocystéine puis en homocystéine (Figure 23). Plusieurs études indiquent qu'un faible apport en folates aboutirait à une diminution globale de la méthylation de l'ADN et a été associée à un risque accru de développer une maladie psychiatrique (Burghardt *et al.*, 2012) ou une MA (Schrötter *et al.*, 2012).

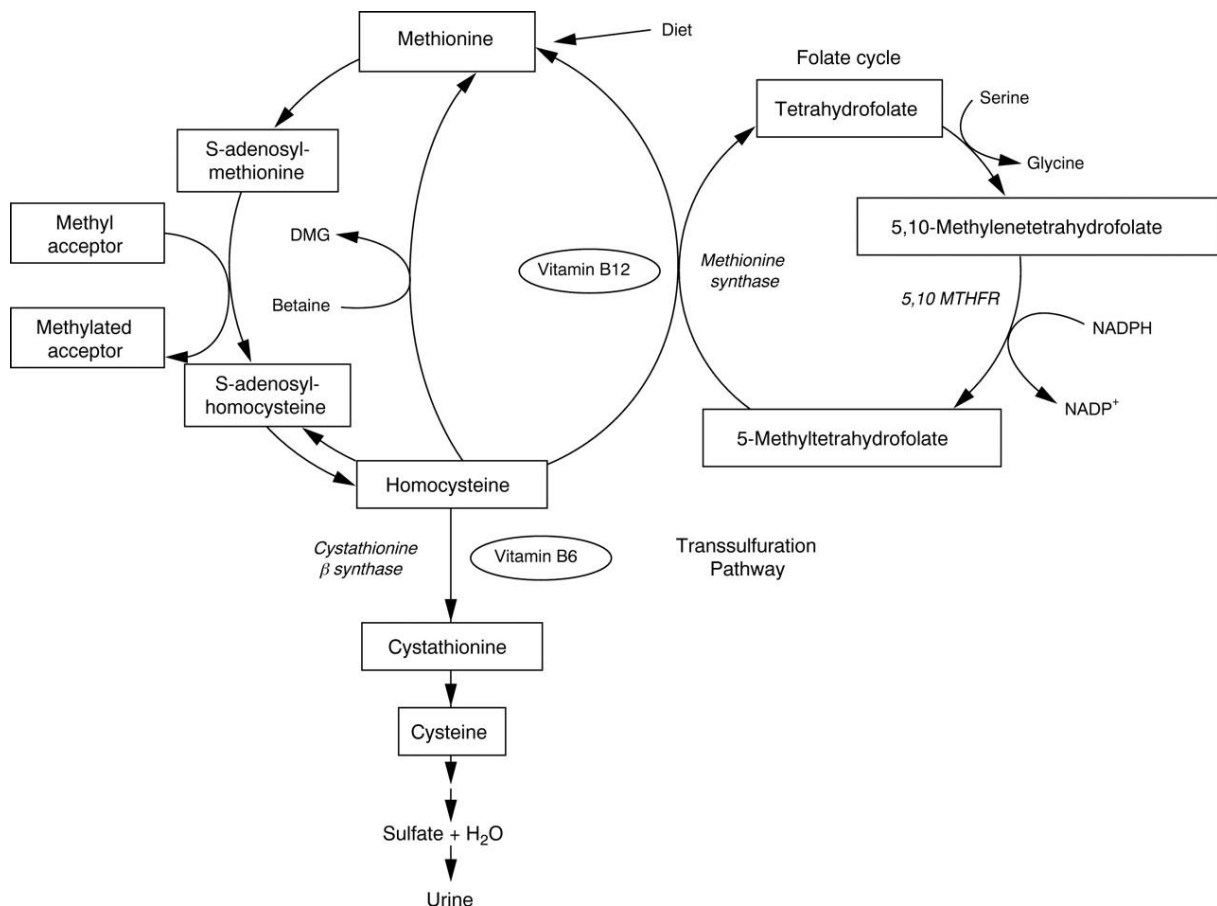


Figure 23 : Cycle de méthylation/déméthylation de l'homocystéine.

Lien entre méthylation de l'ADN et MA

Des variations de la méthylation de l'ADN des cellules cérébrales ont été observées dans les maladies neurodégénératives comme la MA lors d'études portant sur l'ensemble du génome (Wang *et al.*, 2008; Mastroeni *et al.*, 2009; Bakulski *et al.*, 2012). Plusieurs études ont également mis en évidence des altérations épigénétiques dans des cellules et/ou région cérébrales atteintes dans la MA avec une hypométhylation globale de l'ADN des neurones du cortex temporal (Mastroeni *et al.*, 2010) et une diminution de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN dans l'hippocampe (Chouliaras *et al.*, 2013).

D'autres études portant sur un nombre plus limité de gènes candidats ont également retrouvé des altérations de l'ADN de patients atteints de MA (West *et al.*, 1995; Toghi *et al.*, 1999; Barrachina & Ferrer, 2009; Yu *et al.*, HMG. 201; Iwata *et al.*, 2014) (pour revue : (Bennett *et al.*, 2015)). Iwata et collaborateurs ont ainsi démontré que les gènes *MAPT*, *APP* et *GSK3B* présentaient une méthylation de l'ADN anormale qui aboutissaient selon des modèles *in vitro* à des anomalies d'expression de ces gènes (Iwata *et al.*, 2014).

Récemment, des "*epigenome-wide association study*" (EWAS) de la MA ont également vu le jour (Lunnon *et al.*, 2014; De Jager *et al.*, 2014). Ces études correspondent à l'analyse simultanée de nombreux CpG répartis sur l'ensemble du génome chez de nombreux individus. Par exemple, De Jager et collaborateurs ont testé la méthylation de près 416 000 CpG dans une grande cohorte 708 échantillons de tissu cérébraux (De Jager *et al.*, 2014). Ces études ont permis de retrouver 11 régions du génome présentant des différences de méthylation de l'ADN entre témoins et malades. De plus, ces marques épigénétiques étaient significativement associées à l'importance des lésions amyloïdes ou à tau lors de l'examen neuropathologique.

Toutes ces études ne permettent pas de déterminer si la différence de méthylation de l'ADN est une cause ou une conséquence de la MA, mais elles ont permis de démontrer que la méthylation de l'ADN pouvait constituer une signature de cette pathologie dans le cerveau des malades.

Objectifs

Les tauopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives hétérogènes caractérisées par l'accumulation intracérébrale de protéines tau anormales. Dans ces pathologies, la régulation du gène *MAPT*, codant les protéines tau, est perturbée et des variations de l'expression quantitative et/ou de l'épissage de tau sont observées. L'étiologie de ces maladies est encore incertaine, mais le rôle, plus ou moins important selon les pathologies, de l'âge et/ou de facteurs de risque génétiques a été établi. De plus, le rôle de l'environnement en tant que facteur de risque putatif des tauopathies a gagné en importance ces dernières années. Cependant, nous ne savons pas bien expliquer à ce jour comment ces différents facteurs contribuant à la survenue des tauopathies aboutissent tous à un même mécanisme physiopathologique, à savoir l'agrégation de protéines tau anormales. De plus, il est encore plus surprenant que la dérégulation du gène *MAPT* puisse conduire à des maladies si hétérogènes avec l'expression, puis l'agrégation de différentes isoformes de protéines tau.

L'épigénétique est un processus dynamique et réversible qui peut être modifié par de nombreux facteurs génétiques, environnementaux ou encore par l'âge. Elle recouvre de multiples niveaux d'expression des gènes (régulation de l'expression, épissage alternatif, promoteurs alternatifs, diversité des séquences codantes et non codantes des transcrits). De plus, de nombreuses études rapportent une association entre certaines marques épigénétiques et les maladies neurodégénératives. C'est pourquoi l'hypothèse d'une altération épigénétique dans le cerveau des patients atteints de tauopathies constitue une hypothèse séduisante pour expliquer la survenue de ces maladies. En effet, l'existence de modifications épigénétiques de certains gènes altérés dans ces maladies comme le gène *MAPT* pourraient expliquer le mode d'action des différents facteurs de risque génétiques et/ou environnementaux ainsi que l'hétérogénéité clinique et biochimique de ces maladies.

L'étude des protéines tau ainsi que des mécanismes physiopathologiques qui ont lieu dans les tauopathies est le principal thème de recherche du laboratoire. Mais à l'inverse des précédentes études centrées sur les protéines tau ou sur la génétique de ces maladies, cette thèse d'université s'inscrit dans une nouvelle thématique pour le laboratoire cherchant à étudier cette nouvelle « hypothèse épigénétique » de la survenue de tauopathies. Le but de notre étude était de déterminer si des variations de l'épigénome impliquant le gène *MAPT* contribuent à l'expression différentielle des protéines tau observée dans les différentes classes de tauopathies.

C'est pourquoi nous avons débuté dès 2012 la caractérisation d'une banque de prélèvements cérébraux de patients atteints de différentes tauopathies et de témoins.

Etant donné le rôle de l'environnement dans la survenue des tauopathies et grâce à la constitution de notre base de prélèvements cérébraux, une partie de mon travail de thèse a permis dans le cadre d'une collaboration de rapporter un cluster de PSP dans la région de Watrelos (Nord) qui pourrait être lié à une contamination industrielle en métaux lourds.

Caparros-Lefebvre D, Golbe LI, Deramecourt V, Maurage C-A, [Huin V](#), Buée-Scherrer V, *et al.* A geographical cluster of progressive supranuclear palsy in northern France. *Neurology*. 13 oct 2015;85(15):1293-300.

Nous avons ensuite analysé 3 des 5 classes de tauopathies qui présentent des caractéristiques biochimiques spécifiques, afin de rechercher s'il existe un profil de méthylation de l'ADN spécifique à chacune de ces classes. Cette étude qui constitue la majeure partie de cette thèse d'université nous a permis de retrouver une hypométhylation d'une région intragénique de *MAPT* dans une tauopathie particulière : la paralysie supranucléaire progressive, et a mené à la publication suivante :

[Huin V](#), Deramecourt V, Caparros-Lefebvre D, Maurage CA, Duyckaerts C, Kovari E, Pasquier F, Buée-Scherrer V, Labreuche J, Behal H, Buée L, Dhaenens CM and Sablonnière B. The *MAPT* gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain. *Movement disorders*. 2016

Enfin, nous avons cherché à comprendre si ces altérations de l'épigénome étaient associées à des altérations de la transcription de ce gène. Cette étude de l'expression de *MAPT* et de la méthylation de l'intron 0 du gène nous a conduits à étudier un promoteur alternatif du gène. Les résultats préliminaires de ce travail sont présentés dans une dernière partie. Le manuscrit relatif à ce projet est en cours de préparation.

Résultats

Chapitre 1 : Constitution et caractérisation d'une banque de prélèvements cérébraux humain

I- Introduction

Les modifications épigénomiques sont hautement spécifiques des tissus et des types cellulaires. De plus, les modèles cellulaires des maladies qu'ils soient à type de lignée cancéreuse ou de cellules souches pluripotentes induites, ont l'inconvénient majeur de présenter de profondes modifications de leur épigénome. L'étude de la méthylation de l'ADN dans les pathologies humaines nécessite donc de disposer de tissus humains atteints par ces pathologies ou éventuellement d'étudier un très grand nombre de prélèvements plus accessibles comme le sang en espérant que les modifications observées dans le sang corrélerent avec les modifications observées dans le cerveau. Notre étude a été réalisée sur du tissu cérébral humain car c'est le tissu directement atteint par les pathologies d'intérêt ce qui nous permettait de limiter les biais liés au choix des tissus. Le tissu cérébral post-mortem présentait par contre d'évidents soucis de disponibilité et de conservation des échantillons.

De plus, les études de méthylation de l'ADN dans les pathologies psychiatriques et les pathologies neurodégénératives ne retrouvent que de très faibles variations des taux de méthylation. Ces différences de méthylation dans le tissu cérébral sont inférieures à 6 % (Iwata *et al.*, 2014; Bakulski *et al.*, 2012; Carrard *et al.*, 2011) et s'expliquent par un mélange de cellules méthylées et non méthylées dans le cerveau. De plus, seul un faible pourcentage des neurones et/ou des cellules gliales sont affectées dans les tissus cérébraux présentant la pathologie tau. Nous nous attendions donc à observer de très faibles variations de méthylation dans les cerveaux des patients.

Les objectifs de ce travail préliminaire étaient donc de constituer une base de prélèvements cérébraux bien caractérisés et sélectionnés selon des critères stricts afin de limiter au maximum les biais pour les prochaines études.

II- Méthodes

Nous avons collecté des échantillons de nécropsies cérébrales humaines, issus de témoins et de patients atteints de différentes tauopathies provenant de 3 banques de cerveaux (Lille, Paris et Genève).

Le diagnostic de certitude est obtenu *post-mortem* et repose sur l'examen neuropathologique et biochimique réalisé par différents anatomopathologistes expérimentés. Les signes cliniques des patients et la cause du décès si disponibles, ont été collectés mais n'ont pas été considérés pour le diagnostic final des patients.

Nous avons sélectionné les individus témoins ne présentant pas de troubles cognitifs à leur décès et avec un stade de Braak inférieur ou égal à 2. Les patients choisis présentaient un diagnostic neuropathologique de MA, DCB, PSP et de maladie de Pick. Nous n'avons cependant pas analysé les échantillons de patients ou de témoins ayant présenté une pathologie cérébrale chronique et/ou qui aurait pu modifier les taux de méthylation de l'ADN comme un antécédent d'AVC, de saignement intracrânien, une pathologie tumorale cérébrale ou une pathologie inflammatoire cérébrale (SEP, encéphalite paranéoplasique, neurolupus...). Nous n'avons donc pas considéré les individus souffrant de plusieurs causes de neurodégénérescence (association de plusieurs tauopathies ou avec une SLA, démence à corps de Lewy, maladie de Parkinson...). Pour finir, nous n'avons pas pris en compte les prélèvements présentant un intervalle *post mortem* de plus de 48h, ni les individus âgés de moins de 40 ans.

Nous disposons pour chacun des échantillons de l'âge au moment du décès, du sexe, du diagnostic neuropathologique avec notamment le stade de Braak et de l'intervalle *post mortem* (sauf pour 12 échantillons où l'une de ces informations était manquante). Pour la plupart des patients et des témoins, nous avons étudié plus précisément le cortex frontal (Aire A10), puisqu'il est touché dans l'ensemble des tauopathies, et le cortex occipital (Aire A18), qui servait d'aire contrôle car dépourvue de dégénérescence neurofibrillaire dans la plupart des tauopathies étudiées (Figure 24).

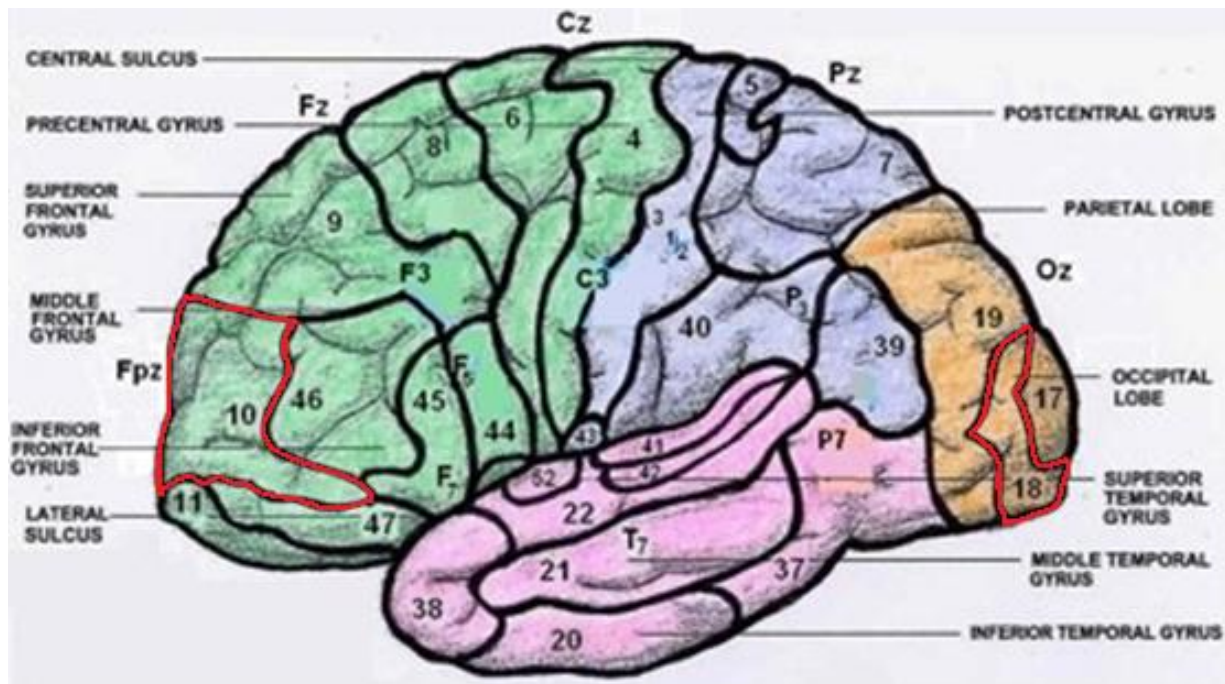


Figure 24 : Régions cérébrales étudiées.

Représentation graphique des différentes aires du cortex cérébral humain selon la classification de Brodmann. Le lobe frontal est colorié en vert, le lobe temporal en rose, le lobe pariétal en violet et le lobe occipital en orange. Les aires cérébrales étudiées A10 (région frontale) et A18 (région occipital) sont surlignées en rouge.

Pour chaque échantillon, nous avons extrait l'ADN tissulaire selon la méthode octanol-chloroforme adaptée au tissu cérébral et précédemment développée dans le laboratoire (Sergeant *et al.*, 2001). Nous avons également extrait les ARN de 80 individus à l'aide du kit RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. La qualité des ARN tissulaires obtenus a été déterminée sur la base du RNA integrity number (RIN) analysant le ratio entre les ARN ribosomiaux 28S et 18S. Nous avons obtenu le RIN en utilisant le RNA 6000 Nano Kit sur le Bioanalyseur 2100 (Agilent, Courtaboeuf, France).

Nous avons également caractérisé sur ces échantillons cérébraux les principaux facteurs génétiques connus des tauopathies étudiées : l'haplotype H1/H2 du gène *MAPT*, le génotype du SNP rs242557 définissant le sous-haplotype H1c et le génotype du gène *APOE* (variants $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$). L'haplotype H1/H2 a été caractérisé par la présence de l'insertion/délétion polymorphique de 238 pb située dans l'intron 9 du gène *MAPT* (Baker *et al.*, 1999). Ce polymorphisme a été analysé par PCR puis électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. Le génotypage du SNP rs242557 et du gène *APOE* ont été obtenus par PCR puis séquençage Sanger sur ABI3730 (Applied Biosystems™, Saint Aubin, France).

III- Résultats

Au total, nous disposons d'échantillons provenant de 111 individus avec pour la plupart un échantillon de la région frontale et un échantillon de la région occipitale, soit 36 patients MA (10 patients Braak 3-4 et 26 Braak 5-6), 10 patients atteints de DCB, 29 patients atteints de PSP et 6 patients atteints de la maladie de Pick, que nous avons comparé à 30 témoins. Le nombre de patients dans le groupe de maladie de Pick étant trop peu important pour permettre la réalisation de tests statistiques, nous avons choisi de ne pas les inclure par la suite dans les analyses de méthylation de l'ADN.

Les ADN obtenus étaient de bonne qualité et de bonne concentration pour des analyses ultérieures avec une moyenne de 50 µl d'ADN à 500 ng/mL. Les dosages ont été réalisés sur NanoDrop® (Thermo Scientific™). Nous avons extraits les ARN cérébraux de 80 individus et obtenus des ARN de bonne qualité en dépit de la dégradation observée habituellement avec ce type d'échantillons tissulaires *post-mortem*. En effet, la moyenne des RIN pour les échantillons frontaux et occipitaux était respectivement de 6,4 et 5,2.

L'ensemble des données de cette base de prélèvements cérébraux humain est résumé dans le tableau 9 de l'annexe 1.

IV- Résultats complémentaires

Dans le cadre d'une collaboration, nous avons pu utiliser les données de notre base de prélèvements cérébraux et les méthodes développées pour sa constitution pour rapporter l'existence d'un cluster de PSP dans la région de Watrelos (Nord).

Des clusters de tauopathies ont déjà été décrits avec les exemples du parkinsonisme de la Guadeloupe (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002) ou du syndrome de l'île de Guam (Elizan *et al.*, 1966). Cependant, il n'avait pas encore été signalé de cluster de PSP caractérisé par une prévalence accrue de PSP dans certaines zones géographiques ou professions. Bien que la PSP ait une incidence très faible de l'ordre de 1,2/100 000 et une prévalence de 5 à 6/100 000 (Schrag *et al.*, 1999; Nath *et al.*, 2001; Bower *et al.*, 1997; Kawashima *et al.*, 2004), 92 patients atteints de PSP ont pu être identifiés et étudiés au Centre Hospitalier de Watrelos durant une période de 8 ans (allant du 1^{er} janvier 2005 au 31 décembre 2012). Ce centre hospitalier couvrant un bassin de population de 55 551 habitants, ce nombre de 92 cas de PSP en 8 ans est beaucoup plus important que le nombre absolu attendu pour cette période qui est de 4,95. Ces cas de PSP ont pu être caractérisés avec précision au plan clinique, radiologique, complétés par les données neuropathologiques, génétiques et biochimiques.

La cause de ce cluster de PSP sera l'objet d'études ultérieures. Cependant les suspicions sont dirigées sur des sites de déchets industriels et l'existence d'une contamination industrielle en métaux lourds. En effet, durant la plus grande partie du 20^{ème} siècle, la région de Watrelos et des villages environnants était un centre pour le traitement du chromate et du phosphate, la teinture textile et le tannage. De nos jours, d'importantes quantités de déchets industriels persistent près des zones résidentielles.

Cette étude a été récemment publiée dans le journal *Neurology* :

Caparros-Lefebvre D, Golbe LI, Deramecourt V, Maurage C-A, [Huin V](#), Buée-Scherrer V, *et al.* A geographical cluster of progressive supranuclear palsy in northern France. *Neurology*. 13 oct 2015;85(15):1293-300.

REFERENCE: Caparros-Lefebvre D, Golbe LI, Deramecourt V, Maurage C-A, Huin V, Buée-Scherrer V, et al., A geographical cluster of progressive supranuclear palsy in northern France. *Neurology*. 13 oct 2015;85(15):1293-300.

AUTHORS: D. Caparros-Lefebvre¹, MD, PhD, L. I. Golbe², MD, V. Deramecourt³, MD, PhD, C. A. Maurage³, MD, PhD, V. Huin,³ MD, V. Buée-Scherrer,³ PhD, H. Obriot,³ MS, F. Caparros,³ MS, B. Sablonnière,³ MD, PhD, L. Buée³, PhD, A. J. Lees⁴ MD

1: Unit of Neurology, Centre Hospitalier de Wattlelos, France

2: Department of Neurology, Rutgers Robert Wood Johnson Medical School,
New Brunswick, NJ, USA

3: University of Lille Nord de France, INSERM UMR 1172, Bâtiment JPARC, France

4: Reta Lila Weston Institute for Neurological Studies, London, UK

Corresponding author: Dr Dominique Caparros-Lefebvre

Centre Hospitalier de Wattlelos, 30, Rue Alexander Fleming - 59393 Wattlelos cedex

France Phone : (33) 6 77 09 08 49 - Fax : (33) 3 20 66 57 98

Email: dcaparroslefebvre@gmail.com

Key words: PSP, heavy metals,

Running title: PSP cluster in Wattlelos

Received January 18, 2015

Accepted May 29, 2015

ABSTRACT:

Objective: To describe a cluster of progressive supranuclear palsy (PSP) in northern France. PSP has not been reported in geographical, temporal, or occupational clusters. A unit of Neurology and Neurogeriatrics opened in 2005 at the Centre Hospitalier de Wattrelos, serving the population of Wattrelos and Leers (combined population 51,551) and parts of neighboring towns. For most of the 20th century, this area was a center for chromate and phosphate ore processing, textile dyeing, and tanning. Significant industrial waste persists close to residential areas.

Methods: From 2005 to 2014, 92 patients with PSP at Centre Hospitalier de Wattrelos were identified and studied. Detailed residential data were available in the medical records. Eighty cases have had magnetic resonance head scanning and 60 have died, of whom 13 have been examined neuropathologically.

Results: The ratio of observed to expected PSP incidence over the period 2005 to 2012 was 12.3 (95% confidence interval: 7.4–35.9). Mean onset age was 74.3 years. The Richardson syndrome/PSP-parkinsonism ratio was 43%/42%. Four other phenotypes each occurred in 2% to 5%. Onset was gait/balance difficulty in 52%. None of the 92 affected patients were relatives and 7 were of North African ancestry. MRI was compatible with a clinical diagnostic of PSP in all cases. Histopathologic examination confirmed neurofibrillary degeneration and tufted astrocytes in all autopsied cases. Western blots revealed a typical tau 4R doublet. The tau H1 haplotype occurred in 95.8% of cases' chromosomes.

Conclusions: We have identified a cluster of PSP in a geographical area with severe environmental contamination by industrial metals.

INTRODUCTION

Progressive supranuclear palsy (PSP) is an uncommon sporadic disorder with no reports in the literature of geographical clusters. Its incidence in developed countries is approximately 1.2 per 100,000 per year and the prevalence of investigator-diagnosed cases is 5 to 6 per 100,000.¹⁻⁴

The cause is unknown but several familial clusters have now been reported.^{5,6} Olfaction, affect, and reaction time assessments revealed more frequent dysfunction among relatives of individuals with PSP than among relatives of controls.⁷

Genetic variations in *MAPT* locus are a mild risk factor for PSP.⁸ An inversion of a 900-kb span of chromosome 17 defines the H1 haplotype.⁹⁻¹¹ A subhaplotype of H1 designated H1c is responsible for the association between the H1 haplotype and PSP.^{12,13}

Studies of nongenetic risk factors have found lesser educational attainment.¹⁴⁻¹⁶ Two geographical clusters of illnesses similar to PSP have been described on Guam¹⁷⁻²⁰ and in Guadeloupe where a case-control survey²¹ revealed a strong association (odds ratio 8.3, $p < 0.001$) of Guadeloupean tauopathy with consumption of traditional medicines containing annonacin,²² a mitochondrial toxin that produces a **tauopathy in a rodent model**.²³

Wattrelos is a town in northern France where textile dyeing plants and tanneries operated for most of the 20th century, using arsenic and chromate from the nearby chemical plants. Arsenic and hexavalent chromium contamination have been documented in the soils of the sites of former plants in Wattrelos and Leers,²⁴ where the cluster of PSP cases described in this report live.

METHODS

Patients.

Wattrelos has one hospital, the Centre Hospitalier de Wattrelos (CHW). It is the only medical facility in the town and has an acute and chronic inpatient and outpatient service. In 2005, a Department of Geriatric Neurology was established in the hospital when one of the authors (D.C.-L.) was appointed to the staff. In April 2007, she diagnosed the first patient with PSP at CHW. By July 2014, 92 patients, all of whom had fulfilled the National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Society for PSP criteria for clinically probable PSP, had been studied.²⁵ Most patients manifested many of the additional supportive criteria for PSP including abnormal neck posture, signs of spastic face, poor or absent response of bradykinesia and axial and bulbar signs to levodopa therapy, early dysphagia and dysarthria, and early cognitive impairment with at least 2 of the following: apathy, abstract thought impairment, decreased verbal fluency, imitation behavior, or frontal release signs. Eighty-nine patients (97%) were referred by primary care physicians and 3 (3%) by neurologists or physiotherapists.

Clinical and imaging study.

Each patient received a trial of carbidopa/levodopa with evaluations at 3 months and 6 months using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale, MRI, videotape records, olfactory testing, Folstein Mini-Mental State Examination, and detailed neuropsychological examination for patients with Mini-Mental State Examination score >19 of 30. The neuropsychological tests comprised the Grober and Buschke test,²⁶ Frontal Assessment Battery,²⁷ Cognitive, Trail Making Test (TMT), Stroop, images description (DO 80), and praxis analysis. Eye and eyelid movements were examined. Saccades, antisaccades, pursuit, and opticokinetic nystagmus (OKN) were tested at the first examination. OKN was evaluated using a handheld OKN tape. Command saccades were considered slow if the progress of the movement in response to direct the eyes to a peripheral target was perceptible to the examiner.

With assistance from family members, we recorded each residential street address since birth, occupations, job descriptions, and hobbies.

Olfactory testing was performed using the European Test of Olfactory Capacities.²⁸ A speech therapist analyzed buccofacial apraxia²⁹ and language (Boston Naming Test). Brain MRI study was performed in all patients except in the 12 with medical contraindications, in whom a CT was undertaken.

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents.

We received approval from the institutional ethical standards committee on human experimentation, and we received written informed consent from all patients (none had guardians).

Epidemiologic study.

The rationale for defining the temporal limits of the cluster analysis to the period 2005 to 2012 is that before author D.C.-L. arrived at CHW in 2005, some cases with PSP would likely have been misdiagnosed. She diagnosed her first case of PSP in Wattrelos in 2007. We censored the incidence analysis in 2012 because cases with onset since then are unlikely to have reached clinical attention to date.

To calculate the expected incidence of PSP, we used the entire population of both Wattrelos and Leers although residents of those towns have the option of seeking neurologic care at the university center in Lille and elsewhere. This may have led us to underestimate the PSP incidence in those 2 towns despite the reports of neurologists in nearby towns that they saw little or no PSP. We obtained population data for 2006 and 2011 and used the mean of these figures to make our calculations. For the expected incidence, we averaged the results of all 4 formal studies of PSP frequency to date,¹⁻⁴ arriving at a figure of approximately 1.2 cases per 100,000 per year. We did not age-adjust because the proportion of the Wattrelos-Leers population aged 60 years and older is similar to that in the areas studied in the 4 surveys.

Pathologic study.

Thirteen postmortem brains were obtained with consent from the patients' families. The left half was fixed in formaldehyde and the right was frozen at -80°C for biochemical and genetic study. Microscopic examination was performed on paraffin-embedded material after staining with hematoxylin and eosin, ubiquitin, [alpha]-synuclein, Gallyas silver, and anti-tau (polyclonal antibody; Dako, Carpinteria, CA; raised against the C-terminal part of the recombinant human protein, including the 4 repeats).

Biochemical study.

Frozen brain samples from the mesencephalon and Brodmann areas (BAs) 4, 10, and 18 were processed as previously described.³⁰ Brain homogenates containing 30 µg of total proteins were loaded on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Western blot analysis was processed using anti-pSer396, a monoclonal antibody against phosphorylated serine 396 on tau proteins (dilution 1:10,000; Invitrogen, Carlsbad, CA). Phosphorylation-independent antibody anti-tau Cter, directed against the last amino acids of tau sequence, was also used at the dilution of 1:10,000.³¹

Molecular genetic study.

DNA was prepared from frontal and occipital cortices by phenol-chloroform extraction. *MAPT* H1/H2 genotyping was performed on brain samples using the 238–base pair insertion/deletion polymorphism in intron 9 as described by Baker et al.⁹ Genotyping of SNP rs42557 was performed by standard PCR reaction and sequencing on an ABI 3130XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers are available upon request.

RESULTS

Epidemiologic data.

We compiled a detailed clinical database of the 92 patients identified since 2007 as having PSP and living in Wattrelos, Leers, and nearby towns. The incidence of PSP elsewhere is 1.2 cases/105/y.¹⁻⁴ The population of Wattrelos in 2011 was 41,538.³² The catchment area for its hospital includes all of that town and most of Leers, immediately to the southeast, with a 2011 population of 9,343,³³ and smaller parts of other towns. Of the 92 incident PSP cases, 62 were living in Wattrelos or Leers at the time of diagnosis and experienced symptom onset between January 1, 2005, and December 31, 2012.

The geography of the cluster appears to be limited largely to Wattrelos and Leers. Inquiries of neurologists at the University of Lille, the closest referral center, revealed only the expected very low frequency of patients with PSP. The places of residence of the 92 patients at the time of PSP onset appear in the figure along with the hospital where they were diagnosed, the slag heaps, and the canal that receives runoff from the heaps. The numbers correspond to the patients' names in alphabetical order.

The total population of Wattrelos and Leers averaged between 2006 and 2011 was 51,511. This gave an at-risk figure for the 8-year observation period of 412,088 person-years, for an expected absolute number of PSP cases of 4.95 over that period. As the observed number of incident cases was 62, the observed to expected (O/E) ratio is 12.3. The 95% confidence interval of the O/E ratio may be estimated by comparison with the interval of 2 to 10 for the prevalence figure (approximately 6 per 100,000) on which the incidence figures were calculated. This would give an interval of 0.4 to 2.0 for the incidence figure of 1.2/100,000/y and yield a 95% confidence interval for the O/E ratio of 7.4 to 35.9.

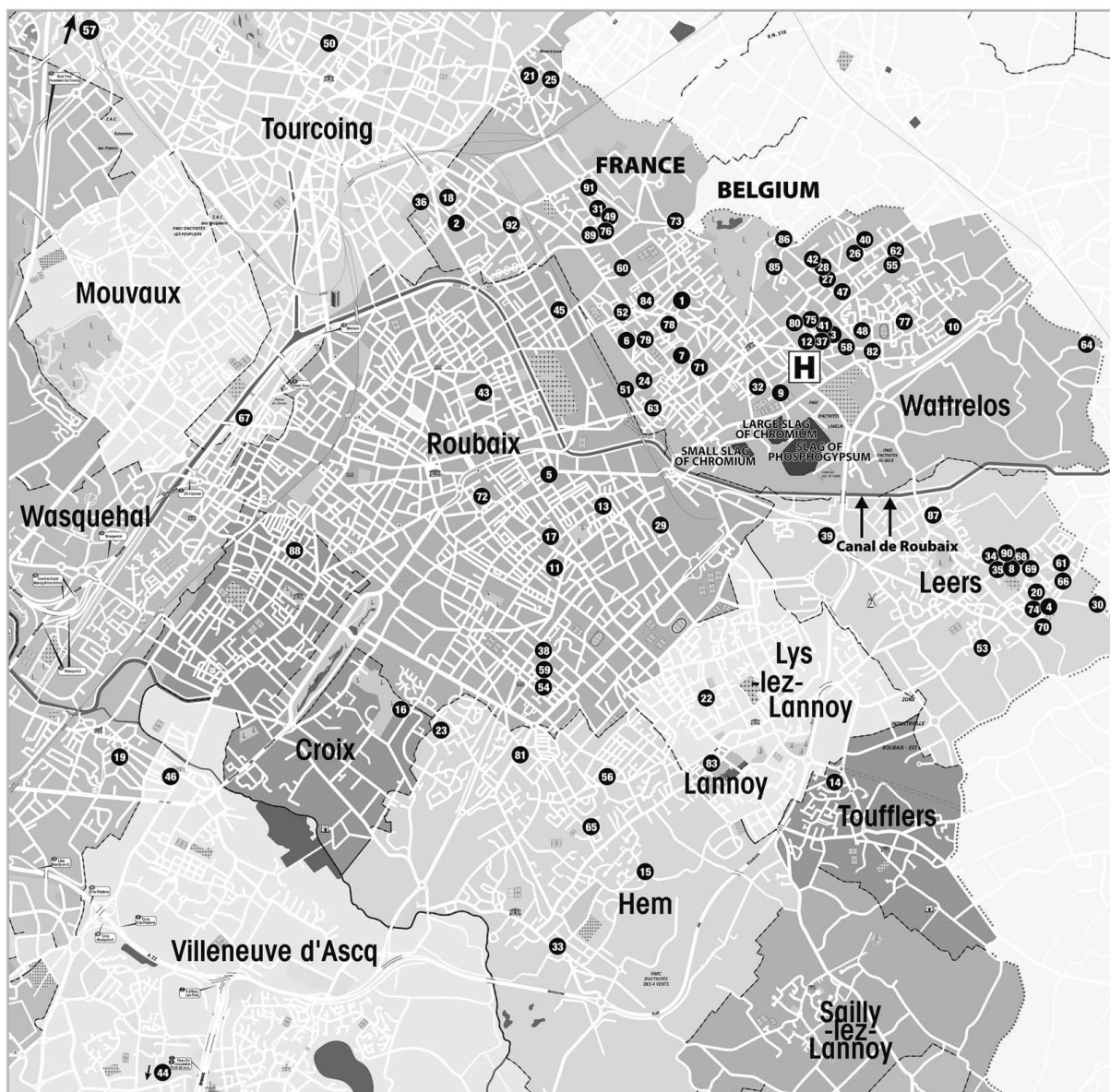


Figure 25 (Article 1, Figure 1) : Places of residence of the 92 patients at the time of PSP onset.

Map showing the places of residence of the 92 patients at the time of PSP onset, along with the hospital where they were diagnosed, the slag heaps, and the canal that receives runoff from the heaps. The numbers correspond to the patients' names in alphabetical order. PSP = progressive supranuclear palsy.

Clinical features of the patients.

For the 92 patients ascertained from April 2007 to July 2014, the male to female sex ratio was 1.11, with 43 women. The mean age at onset was 74.3 years (SD 7.89, range 50–93) (women, 75.9 years; men, 71.9 years). Onset age differed slightly between PSP in this cluster and sporadic PSP in New Jersey³⁴ (67, SD 7.3 years) but was similar to the onset age in the UK study.² The fraction of the population aged 60 years and older does not differ between Wattlelos (16.6%) and other studies. For the 60 patients known to be deceased, disease duration was 5.74 years (SD 2.2, range 2–12). At the first examination, phenotypic

variants included Richardson syndrome in 30 patients (33%), PSP-parkinsonism in 49 (53%), progressive aphasia with PSP in 2 (2%), speech apraxia with PSP in 5 (5.4%), pure akinesia with gait freezing (PAGF) in 3 (3%), and frontotemporal dementia with PSP in 3 (3%).

The first symptom was gait or balance problems in 52%, very close to the 60% in the literature for PSP, axial and/or symmetric parkinsonism in 21%, cognitive decline in 14%, speech disorders in 8%, tremor in 2%, and visual difficulties in 1%. Eighty-nine percent reported falls at the first examination. Seventy-seven percent of patients experienced backward falls. All patients had prominent body bradykinesia and axial rigidity. Twenty percent had rest tremor. At first examination, vertical saccadic eye movements were slow in 85%, and down gaze was absent in 15%. Fifteen percent had square wave jerks.

As the disease progressed (3 years' follow-up), the ratio of phenotypic variants changed, and 40 patients (43%) had Richardson syndrome while 39 patients (42%) had PSP-parkinsonism. At the late stage of the disease, all patients fulfilled ocular motor criteria for PSP with restriction of vertical eye motion higher than 50% and slow vertical saccadic eye movements. Forty-three patients had complete vertical gaze palsy as demonstrated in the video on the Neurology® Web site at <http://neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000001997>.

In patients with Richardson syndrome, eyelid symptoms, including eyelid apraxia and blink frequency below 1/min were present in all patients after 3 years of disease progression. In PSP-parkinsonism, eyelid motion was reduced but preserved, and blepharospasm was more common and seen in 5 patients. Fifty-six patients had eyelid apraxia (61%), 40 with Richardson syndrome (100%) and 16 with PSP-parkinsonism (40%). OKN quick phases were absent in all patients and antisaccades were impaired in all patients.

Only one patient experienced a significant and sustained response to carbidopa/levodopa, with a 40% improvement in the Unified Parkinson's Disease Rating Scale, during 3 years. The lack of levodopa responsiveness was obvious in all cases but one.

This cluster differs in its distribution of PSP's major clinical subtypes, Richardson syndrome and PSP-parkinsonism (43%:42% vs 54%:32%,³⁵ respectively).

Thirteen patients to date have come to autopsy, 9 with Richardson syndrome (66%), 2 with speech apraxia (15%), one with PSP-parkinsonism, and one with PAGF.

Initial cognitive testing showed impaired episodic memory in 84 patients (91%) and biographic memory in 76 patients (83%). The Frontal Assessment Battery was performed in 47 patients, with mean score (of best possible 18) of 10.3 (SD 3.88). We administered the Grober and Buschke test to the 28 patients able to perform it. It showed reduced free recall (mean: 6.5 words/16; SD 2.5) and preserved cued remembering (mean: 14.5/16; SD 2). The mean results for TMT A was 83 seconds (SD 34; below 50th percentile) and for TMT B was 241 seconds (SD 120; 25th percentile 25). Patients had a mean of 2 errors on the Stroop test. Olfactory testing showed severe hyposmia in all patients, with a mean identification of 5 smells out of 16.

None of our patients or surviving relatives endorsed a family history of PSP. Family history of neurologic disorders was claimed by 13 patients (14%): dementia in 9 (10%) and

parkinsonism in 4 (4%). Seven (8%) of our patients were of North African ethnic origin and were born in Algeria.

MRI was performed in 80 patients (87%). T1-weighted axial images showed midbrain atrophy in all cases, with loss of convexity of the lateral margin of the midbrain tegmentum, and widened interpeduncular angle. Thinning of the tectum and atrophy of the superior colliculi were common. A hummingbird sign was obvious in patients with Richardson syndrome, with normal pontine diameter.

Pathology.

All 13 autopsied cases satisfied neuropathologic criteria for definite PSP.³⁶ Macroscopic examination showed global atrophy disproportionately affecting brainstem. Microscopic study (table) showed severe neuronal loss involving substantia nigra and locus coeruleus. AD2 antibody showed diffuse tau protein deposits. Globoid neurofibrillary tangles and tufted astrocytes were prominent in the substantia nigra, subthalamic nucleus, locus coeruleus, midbrain tegmentum, cerebellar nuclei, cerebellar cortex, pallidum, and bulb. Neurofibrillary tangles were less abundant in entorhinal, temporal, and primary motor cortices. Tau deposits were less abundant in the subthalamic nucleus in 2 patients with PSP-parkinsonism and PAGF.

In 2 patients with PSP and speech apraxia phenotype, neurofibrillary tangles were prominent in motor cortex and fronto-opercular cortex. In one patient with mild cognitive impairment, neurofibrillary tangles involved mainly the subcortical areas. Moderate [beta]-amyloid deposition was observed in hippocampal cortex and frontal and motor cortex in older patients. It was observed in 8 brains (61%): moderate in 1 (8%) and more pronounced in 7 (53%). No brain revealed [alpha]-synuclein staining.

Vascular lesions were additionally seen in 3 patients (23%), and consisted of vascular lacunes, which appeared as hyperintensities in the white matter on fluid-attenuated inversion recovery MRI sequences, in 2 patients. The extent, intensity, and location of those lesions do not suggest that they would explain the neurologic findings that supported the diagnosis of PSP. One patient had a contraindication to MRI and correlations with pathology were not available.

Biochemical results.

Immunoblotting analysis of the different affected brain regions (mesencephalon and primary motor cortex [BA4]) of the first 12 autopsied PSP cases revealed, using the phosphorylation-dependent antibody anti-pSer396, the typical tau electrophoretic profile consisting of a main doublet at 64 and 69 kDa. However, heterogeneity in the signal intensity was observed among the different brain regions. Occipital cortex was never affected whereas frontal areas (BA10) were differentially affected among PSP cases. These findings were consistent with neuropathologic data obtained with AD2 antibodies (the latter is similar to pSer396 antibody).

Genetic results.

Of the 24 chromosome 17s in the first 12 autopsied cases, 23 (96%) bore the H1 haplotype. The frequency of allele A of SNP rs242557 occurred in 66.7%. All of the frequencies are similar to those previously described in PSP 10–13 with an overrepresentation of the H1 haplotype and H1c subhaplotype.

Localization and density of tau protein	Patient no.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Phenotypic variants	RS	RS	RS	PAGF	RS	PSP-P	RS	RS	RS	RS	RS	AOS	AOS
Primary motor cortex (BA4)	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++
Premotor cortex (BA8/9)	+	++	+	+	+	++	++	++	++	++	+	+++	+++
Temporal cortex (BA38)	0	0	0	0	0	++	+	+	0	0	+	+	++
Parietal cortex (BA39)	0	++	0	0	0	+	0	0	0	++	0	++	++
Hippocampus	+	+	+	+	+	+++	+, grains	+	+	+	+	+	+++ , grains
Medulla	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Subthalamic nucleus	+++	++	++	+	++	+	+	+++	++	+	+	+	+++
Thalamus	+	+	++	++	+++	+	++	++	+	+++	+	+	+++
Striatum	+	+	+	+	+	0	+	++	+	+	+	0	+++
Pallidum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Pre-pectoral area	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Periaqueductal gray	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+++
Substantia nigra	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Locus coeruleus	++	++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Nucleus dentatus (cerebellum)	+++	++	++	+	++	++	+	+++	+	+++	++	+	+++
Other stains													
β -Amyloid (Thal phase/5)	0	0	1	2	0	3	0	3	2	0	3	2	4
α -Synuclein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Other lesions					Lacunes white matter, pons	AD neuritic plaques		Micro-lacunes in basal ganglia			Moderate CAA and arteriolosclerosis		AD neuritic plaques

Tableau 6 (Article 1, Tableau 1) : Anatomical pathologic findings in the 13 autopsied cases from the Watrelos/Leers PSP cluster.

Abbreviations: AD = Alzheimer disease; AOS = apraxia of speech; BA = Brodmann area; CAA = cerebral amyloid angiopathy; PAGF = pure akinesia with gait freezing; PSP = progressive supranuclear palsy; PSP-P = PSP-parkinsonism; RS = Richardson syndrome. Semiquantitative tau burden in the 15 major areas involved in PSP from 0 to +++ (0 = absent; + = mild; ++ = moderate; +++ = severe). Semiquantitative β -amyloid and α -synuclein burden from 0 to 3.

DISCUSSION

Investigations to date suggest that this cluster of PSP is centered on Wattlelos and Leers, with very few patients living more than a few kilometers away. Some of the patients who died or discontinued medical care at CHW before the arrival of the first author at the hospital are likely to have been misdiagnosed as Parkinson disease or diffuse cerebrovascular disease.

The distribution of the residences shows high concentration of patients in the eastern part of Leers. A planned further study will include places of residence at multiple time points preceding PSP onset and equivalent time points for controls. The pathologic and biochemical features of the 13 autopsied cases were typical of PSP. As reported by Williams et al.,³⁵ tau burden was less important in the subthalamic nucleus in patients with PSP-parkinsonism and PAGF. Vascular lacunes were observed in 3 cases of Richardson syndrome, but were judged to have no conclusive influence on the clinical picture with the possible exception of cognition.

The cause of the cluster will be the subject of subsequent studies. Suspicion must first be directed at the site just south of the center of Wattlelos, where large heaps of spent ore (slag) from now-defunct metals extraction industry are located. Other locations in the immediate area may have been contaminated by the numerous textile-dyeing and leather-tanning plants that used metals in their processes. Many residents of the area raise fruits and vegetables in vegetable gardens and allotments for family consumption and for sale at local markets. Some plant products such as thyme commonly grown in home gardens in Wattlelos are consumed by its residents and have been found to concentrate arsenic and other toxic metals.³⁷

Arsenic, a potential neurotoxin, has been found in the soil at the sites of the former chemical plants in Wattlelos 24 and is present in the phosphate ore formerly processed there, as described also in Pakistan.³⁸ Contamination with chromium is common in Wattlelos, but we consider it to be a less likely candidate as a neurotoxin although a synergistic toxicity with arsenic is possible. Aluminum, suspected in the past of a causal link to Alzheimer disease, was not processed in this area.

A genetic founder effect must be considered. None of the patients knew of a relative with a diagnosis of PSP. The proportion with dementia or parkinsonism among family members was no greater than expected, but conclusions await a formal case-control survey. The genetic analysis of the most important genetic risk factors (haplotype H1 and subhaplotype H1c of *MAPT*) showed the expected distribution in the 12 autopsied cases. A future study should compare cases and local controls for genetic markers known to be associated with PSP and also seek still-unsuspected genomic and epigenetic etiologies using more advanced methods.

The pathology of PSP has similarities with postencephalitic parkinsonism although the clinical picture is very different. Our informal inquiries and our access to medical records failed to reveal evidence of any epidemic of encephalitis or of a history of such illness in any of the affected individuals.

If the cause of this cluster can be found, it will provide an important clue to the cause of PSP elsewhere and, by implication, a possible causative factor for other tauopathies.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge with their permission Caroline Destombes and Nathalie De Meulemeester Clorennec from RAVET-ANCEAU Department of Cartography and Infography; Patrice Gelé, engineer in charge of the brain bank in Lille; Sophie Lamballais, neuropsychologist at CHW; and Florence Levasseur, speech therapist. The authors thank John C. Steele, MD, for allowing the authors to produce the video from his examination of one of their patients with PSP.

GLOSSARY

BA: Brodmann area

CHW: Centre Hospitalier de Wattrelos

O/E: observed to expected

OKN: opticokinetic nystagmus

PAGF: pure akinesia with gait freezing

PSP: progressive supranuclear palsy

TMT: Trail Making Test

Supplemental data at

<http://neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000001997>.

REFERENCES

1. Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn N. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 1999;354:1771–1772.
2. Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, et al.. The prevalence of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) in the UK. *Brain* 2001;124:1438–1449.
3. Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rossa WA. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 1997;49:1284–1288.
4. Kawashima M, Miyake M, Kusumi M, Adachi Y, Nakashima K. Prevalence of progressive supranuclear palsy in Yonago, Japan. *Mov Disord* 2004;19:1239–1240.
5. Rojo A, Pernaute RS, Fontán A, et al.. Clinical genetics of familial progressive supranuclear palsy. *Brain* 1999;122:1233–1245.
6. Fujioka S, Algom AA, Murray ME, et al.. Similarities between familial and sporadic autopsy-proven progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2013;80:2076–2078.
7. Baker KB, Montgomery EB Jr. Performance on the PD test battery by relatives of patients with progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2001;56:25–30.
8. Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, et al.. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet* 2011;43:699–705.
9. Baker M, Litvan I, Houlden H, et al.. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999;8:711–715.
10. Pittman AM, Myers AJ, Duckworth J, et al.. The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 2004;13:1267–1274.

11. Houlden H, Baker M, Morris HR, et al.. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 2001;56:1702–1706.
12. Rademakers R, Melquist S, Cruts M, et al.. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 2005;14:3281–3292.
13. Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, et al.. The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis* 2007;25:561–570.
14. Golbe LI, Rubin RS, Cody RP, et al.. Follow-up study of risk factors in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1996;47:148–154.
15. Vidal JS, Vidailhet M, Derkinderen P, de Gaillarbois TD, Tzourio C, Alperovitch A. Risk factors for progressive supranuclear palsy: a case-control study in France. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:1271–1274. Texte Integral Biblioinserm
16. Golbe LI. The epidemiology of progressive supranuclear palsy. *Handb Clin Neurol* 2008;89:457–459.
17. Lepore FE, Steele JC, Cox TA, et al.. Supranuclear disturbances of ocular motility in Lytico-Bodig. *Neurology* 1988;38:1849–1853.
18. Miklossy J, Steele JC, Yu S, et al.. Enduring involvement of tau, beta-amyloid, alpha-synuclein, ubiquitin and TDP-43 pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam (ALS/PDC). *Acta Neuropathol* 2008;116:625–637.
19. Winton MJ, Joyce S, Zhukareva V, et al.. Characterization of tau pathologies in gray and white matter of Guam parkinsonism-dementia complex. *Acta Neuropathol* 2006;111:401–412.

- 20.** Arif M, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Garruto RM, Iqbal K. Tau pathology involves protein phosphatase 2A in parkinsonism-dementia of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:1144–1149.
- 21.** Caparros-Lefebvre D, Sergeant N, Lees A, et al.. Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain* 2002;125:801–811.
- 22.** Caparros-Lefebvre D, Elbaz A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Caribbean Parkinsonism Study Group. Lancet* 1999;354:281–286.
- 23.** Höllerhage M, Matusch A, Champy P, et al.. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. *Exp Neurol* 2009;220:133–142.
- 24.** Basol Recherche. Available at: <http://basol.developpement-durable.gouv.fr/politique-nationale.htm>. Accessed April 12, 2015.
- 25.** Litvan I, Agid Y, Calne D, et al.. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP International Workshop. *Neurology* 1996;47:1–9.
- 26.** Grober E, Buschke H, Crystal H, Bang S, Dresner R. Screening for dementia by memory testing. *Neurology* 1988;38:900–903.
- 27.** Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000;55:1621–1626.
- 28.** Thomas-Danguin T, Rouby C, Sicard G, et al.. Development of the ETOC: a European test of olfactory capabilities. *Rhinology* 2003;41:142–151.
- 29.** Lhermitte F, Ducarne B. Plan of clinical examination of aphasic subjects. *Rev Prat* 1965;15:2365–2374.

- 30.** Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Wattez A, Delacourte A. Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett* 1997;412:578–582.
- 31.** Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, et al.. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2001;10:2143–2155.
- 32.** Institut national de la statistique et des études économiques. Base de donees: Commune de Watrelos. Available at: <http://www.insee.fr/fr/themes/comparateur.asp?codgeo=com-59650>. Accessed April 12, 2015.
- 33.** Institut national de la statistique et des études économiques. Base de donees: Commune de Leers. Available at: <http://www.insee.fr/fr/themes/comparateur.asp?codgeo=com-59339>. Accessed April 12, 2015.
- 34.** Golbe LI, Ohman-Strickland PA. A clinical rating scale for progressive supranuclear palsy. *Brain* 2007;130:1552–1565. Texte Integral Biblioinsert
- 35.** Williams DR, de Silva R, Paviour DC, et al.. Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. *Brain* 2005;128:1247–1258. Texte Integral Biblioinsert
- 36.** Litvan I, Hauw JJ, Bartko JJ, et al.. Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:97–105.
- 37.** Arpadjan S, Celik G, Taskesen S, Güçer S. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2871–2875.
- 38.** Javied S, Waheed S, Siddique N, Chaudhry MM, Irfan N, Tufail M. Arsenic pollution from phosphogypsum produced at Multan, Pakistan. *Nucleus* 2009;46:219–224.

Chapitre 2 : La méthylation de l'ADN du gène *MAPT* : une signature des tauopathies

I- Introduction

Contexte de l'étude

Les tauopathies, caractérisées par l'agrégation de protéines tau anormales, présentent des profils biochimiques très variables selon les pathologies avec des différences concernant les modifications post-traductionnelles des protéines, notamment la phosphorylation et le contenu en isoformes tau agrégées. Il existe plusieurs isoformes cérébrales, qui diffèrent par la présence ou non des exons alternatifs 2 et 10 ainsi que, dans une moindre mesure, les exons 3 et 6. Ces différences ont permis de définir 4 classes de tauopathies selon le profil d'agrégation des isoformes de protéines tau. A l'heure actuelle, certains facteurs de risques de développer les tauopathies comme le génotype $\epsilon 4$ de l'ApoE, l'haplotype H1 du gène *MAPT* qui code les protéines tau, ou certains facteurs environnementaux ont été décrits. Cependant, malgré le nombre impressionnant d'études sur le gène *MAPT*, nous ne savons toujours pas comment ce gène est dérégulé et aboutit à la synthèse de ces protéines tau anormales.

De nombreuses études, notamment dans le laboratoire, ont tenté d'élucider le rôle des modifications post-traductionnelles des protéines tau dans la survenue de tauopathies. D'autres études ont porté sur les différents mécanismes et facteurs de risques génétiques ou environnementaux. Dans notre étude, nous avons poursuivi une autre hypothèse considérant que des altérations épigénétiques dans le cerveau des patients atteints de tauopathies pourraient être responsables d'une dérégulation du gène *MAPT*, de la synthèse de protéines tau anormales et ainsi être impliquées dans la survenue de différentes tauopathies.

L'analyse de la séquence du gène *MAPT* sur UCSC Genome Browser permet d'observer une accumulation de marques épigénétiques comme la méthylation de l'ADN dans différentes régions du gène. Les régions concernées sont le promoteur, situé en 5' et au niveau de l'exon 0, ainsi que plusieurs régions intragéniques comme les exons alternatifs 2, 3, 10 et leurs régions introniques flanquantes. De plus, il existe également une accumulation significative de marques épigénétiques au niveau d'une portion de l'intron 0 à plusieurs mégabases de distance de l'exon 0. Cette dernière région intragénique est d'autant

plus intéressante que le gène *MAPT* est suspecté de posséder plusieurs promoteurs alternatifs dont au moins un dans l'intron 0. La méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs (constitutif et alternatifs) du gène pourrait ainsi se traduire par des variations quantitatives dans l'expression des protéines tau. Les modifications épigénétiques intragéniques localisées au niveau des exons alternatifs du gène pourraient également influencer l'épissage alternatif et se traduire par des variations qualitatives de l'expression de différents transcrits.

Objectif de l'étude

Le but de notre étude est donc de déterminer si des variations de l'épigénome impliquant le gène *MAPT* contribuent à l'expression différentielle des protéines tau observée dans les différentes classes de tauopathies. Nous avons étudié la méthylation de l'ADN du gène *MAPT* chez des patients atteints par différentes tauopathies dans lesquelles *MAPT* est exprimé, afin de rechercher s'il existe un profil de méthylation spécifique à chacune de ces pathologies.

Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article publié dans le journal *Movement Disorders* en 2016. Brièvement, notre étude a permis de mettre en évidence chez les patients atteints de PSP une hypométhylation d'une CpG localisée dans l'intron 0 du gène *MAPT*. Nous avons observé cette différence dans le cortex frontal affecté par la pathologie tau. A l'inverse, nous n'avons pas observé de différence significative dans le cortex occipital dépourvu de la pathologie tau dans la PSP. Cette différence est restée significative après réplique de l'étude et après ajustement sur les facteurs de confusion potentiels (âge et génotype H1/H1 de *MAPT*). De façon intéressante, nous avons également observé dans le tissu cérébral des patients atteints de PSP une hyperexpression des ARNm de *MAPT* par rapport aux témoins. Cette différence d'expression a été observée à nouveau dans la région frontale atteinte par la pathologie et non dans la région occipitale. Nous n'avons cependant pas pu corrélérer l'hypométhylation de l'intron 0 de *MAPT* avec l'expression des ARNm. En conclusion, notre étude démontre que des régions du gène *MAPT* autres que le promoteur constitutif pourraient être impliquées dans la régulation du gène dans les tauopathies. De plus, nous démontrons que l'hypométhylation de l'ADN de l'intron 0 de *MAPT* constitue une signature épigénétique spécifique de la PSP.

II- Résultats préliminaires

Ayant choisi d'étudier la méthylation de l'ADN sur du tissu cérébral humain, nous nous attendions à obtenir un faible nombre d'échantillons. De plus, nous nous attendions à observer de faibles variations des taux de méthylation de l'ADN (de l'ordre de 5 %). Or, à l'échelle d'un gène entier chaque site de méthylation de l'ADN doit être considéré comme un test indépendant et donne lieu à une correction statistique pour la réalisation de tests multiples comme une correction de Bonferroni ou de Dunnett. La réalisation d'un trop grand nombre de tests auraient alors rendu quasiment impossible l'obtention d'un résultat significatif. Nous avons donc limité et surtout ciblé les régions du gène à analyser.

Choix des régions d'intérêt

Nous avons réalisé dans un premier temps un screening *in silico* des régions régulatrices candidates de *MAPT*. A partir de la base de données UCSC regroupant les données du projet ENCODE (Harrow *et al.*, 2006), nous avons recherché quelles régions du gène *MAPT* pouvaient réguler l'expression des transcrits cérébraux de protéines tau. Nous avons ainsi recherché des régions accumulant diverses marques épigénétiques et/ou fixant de nombreux facteurs de transcription regroupés en cluster. En effet, ces marques sont le reflet de régions génomiques majeures dans la régulation de la transcription et/ou de l'épissage des gènes.

Les critères que nous avons considérés pour sélectionner les régions d'intérêt étaient : la présence d'un exon de *MAPT* subissant un épissage alternatif dans le cerveau humain, d'un îlot CpG, de cluster de facteurs de transcription, la fixation d'ARN polymérase II et/ou de facteur CTCF pouvant signer la présence d'un "isolateur". Nous avons aussi considéré les régions présentant les modifications post-traductionnelles des histones en faveur d'un promoteur ou d'un enhancer (Heintzman *et al.*, 2007). Ces marques épigénétiques consistent en (i) la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4Me1) qui est associée avec les enhancers; (ii) la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4Me3) qui est associée aux promoteurs; (iii) l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac) qui est associée à l'activation des promoteurs et des enhancers (Tie *et al.*, 2009 ; Rada-Iglesias *et al.*, 2011). De manière arbitraire, nous avons décidé que les régions d'intérêt devaient présenter au moins trois de ces critères. Enfin, nous n'avons pas considéré les régions répétées du génome selon les résultats du logiciel RepeatMasker.

Cette première analyse *in silico* nous a permis de dégager 5 régions d'intérêt correspondant aux exons 0, 2, 3 et 10 de *MAPT* ainsi que leurs régions introniques flanquantes. Nous avons aussi sélectionné une petite portion de l'intron 0 localisée 54 Mb

en 3' de l'exon 0 et qui comprenait un petit îlot CpG. Par ailleurs, un cluster de facteurs de transcription, ainsi que l'ARN polymérase II et CTCF s'hybrident à cette région intronique. Elle présente aussi des marques épigénétiques compatibles avec un promoteur ou un enhancer (Figure 26).

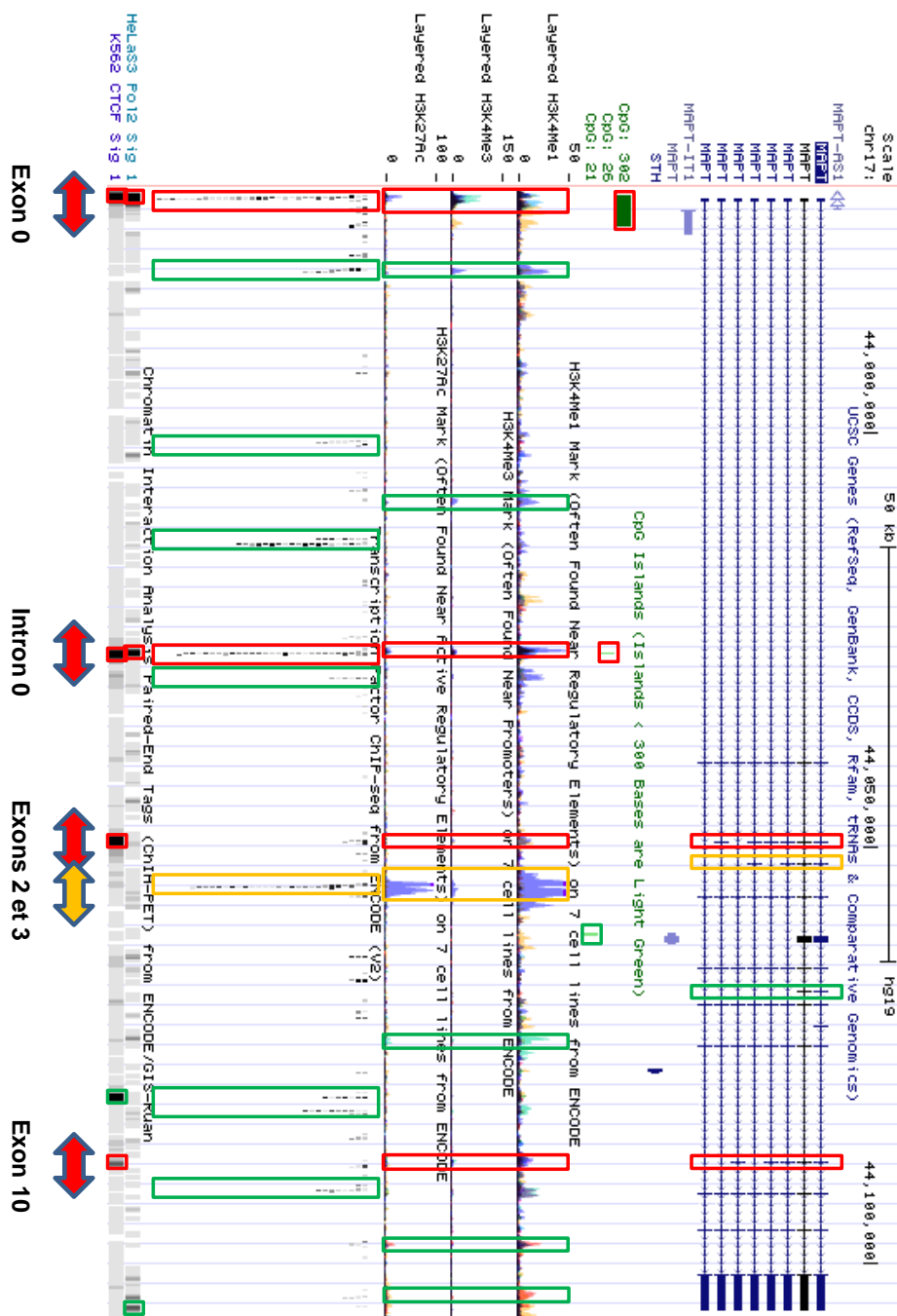


Figure 26 : Analyse *in silico* des régions d'intérêt du gène *MAPT*.

Les exons alternatifs dans le cerveau du gène *MAPT*, les îlots CpG, les marques épigénétiques, les clusters de facteurs de transcription, les zones de fixation de l'ARN polymérase II et de CTCF sont encadrés sur cette capture d'écran de la base de données UCSC (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A43970748%2D44106699&hgsid=504900221_AwMR_SjlgibVx5OJy74sTTKEzaaMn). Les marques localisées dans les mêmes régions du gène sont encadrées en rouge et les marques isolées en vert. Nous avons considéré également l'exon 3 qui subit un épissage alternatif dans le cerveau et qui présentait des marques épigénétiques intenses assez proche dans l'intron 3 (encadrés en orange). Les 5 régions sélectionnées sont représentées par les doubles flèches colorées.

Analyse préliminaire par PCR-séquençage Sanger après traitement au bisulfite

Dans un second temps, nous avons réalisé un séquençage Sanger après traitement au bisulfite de sodium de l'ensemble des régions précédemment sélectionnées. Ce séquençage Sanger a concerné l'ensemble des exons 0, 2, 3 et 10 de *MAPT* ainsi qu'au moins 500 pb en 5' et en 3' de ces exons. Pour l'intron 0, nous avons séquencé l'ensemble du petit îlot CpG et 500 pb en 5' et en 3'. Nous avons réalisé le séquençage Sanger chez 2 patients MA et 1 témoin, tous les trois au niveau de la région frontale.

Ces analyses préliminaires nous ont ainsi permis d'observer que les deux îlots CpG testés (dans l'exon 0 et l'intron 0) étaient peu méthylés, ce qui était plutôt en faveur d'une activation de ces régions. De plus, les taux de méthylation étaient très élevés (> 95 %) pour les régions des exons 2 et 3 et très faibles pour l'exon 0 (< 5 %). Nous avons donc limité nos études aux régions des exons 10 et de l'intron 0 qui avaient des taux de méthylation intermédiaires, ce qui nous permettait de détecter des variations mêmes modérées de la méthylation entre les patients et de respecter les domaines de linéarité des techniques de mesure de la méthylation de l'ADN.

Un exemple de séquençage Sanger après traitement au bisulfite de la région de l'exon 10 est présenté en annexe 2.

Pyroséquençage de l'exon 10 de *MAPT*

Une quantification plus précise a ensuite été menée par pyroséquençage après traitement au bisulfite lors d'une analyse à petite échelle chez 11 témoins et 44 patients (28 MA, 4 DCB, 8 PSP et 4 Pick). Six pyroséquences du gène *MAPT* ont été réalisées, 3 pyroséquences dans la région de l'intron 0 et 3 autres dans la région de l'exon 10. Une séquence de l'intron 0 s'est révélée ininterprétable en raison de mauvaises amplifications par PCR aboutissant à de nombreuses données manquantes et à un manque de reproductibilité. Les deux autres séquences de l'intron 0 ont été retenues et analysées sur l'ensemble des échantillons disponibles (Cf. Article « *The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain* »).

Une représentation schématique des 3 pyroséquences de l'intron 0 est présentée dans la figure 1 de l'article « *The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain* ». La localisation des 3 pyroséquences de l'exon 10 est représentée par la figure 27. Un exemple de pyroséquence de la région de l'exon 10 est présenté en annexe 3.

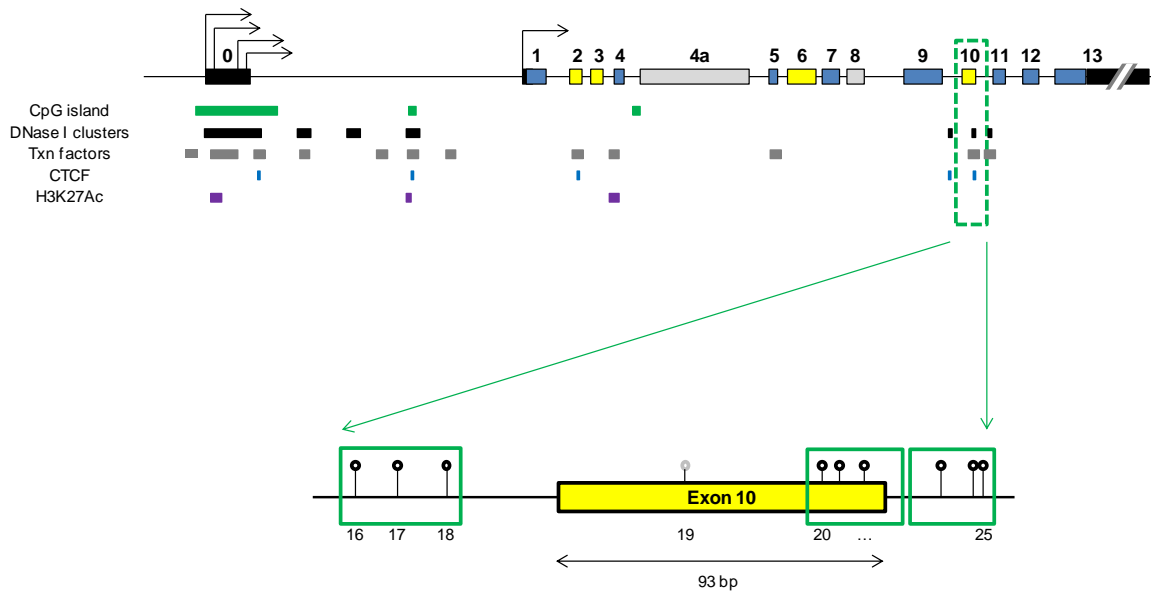


Figure 27 : Localisation des pyroséquences de l'exon 10.

Représentation schématique du gène *MAPT*. Les rectangles représentent les exons et les lignes les introns. Les régions non traduites sont colorées en noir, les exons constitutifs sont colorés en bleu, les exons alternatifs dans le cerveau sont colorés en jaune et les exons subissant un épissage alternatif dans d'autres tissus en gris. Les différents sites d'initiation de transcription sont représentés par des flèches noires. Les marques de régulation issue de la base de données UCSC sont représentées sous le gène dans des boîtes colorées. Les trois pyroséquences de la région de l'exon 10 sont représentées par les cadres verts et les CpG analysées par les cercles noirs. Les localisations sur le génome sont notées en pb selon la version GRCh38.p7 du génome humain.

Concernant l'exon 10, nos premiers résultats n'ont pas retrouvé de variations de méthylation dans un groupe de malades par rapport aux témoins. Nous n'avons donc pas poursuivi les analyses sur l'ensemble des échantillons. En revanche, nous avons retrouvé un effet important de l'haplotype H1/H2 du gène *MAPT* sur le taux de méthylation de plusieurs des cytosines testées. En effet, les cytosines CpG 18 à 24 dans la région de l'exon 10 présentent des taux de méthylation significativement plus faible avec un taux de méthylation moyen de 73,42 % chez les patients de génotype H1/H1 et de 77,7 % rapport aux génotypes H1/H2 et H2/H2.

III- Article 2 : *The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain*

REFERENCE: **Huin V**, Deramecourt V, Caparros-Lefebvre D, Maurage CA, Duyckaerts C, Kovari E, Pasquier F, Buée-Scherrer V, Labreuche J, Behal H, Buée L, Dhaenens CM and Sablonnière B. The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain. *Movement disorders*. 2016, *in press*

AUTHORS: Vincent Huin^{1*}, MD; Vincent Deramecourt¹, MD, PhD; Dominique Caparros-Lefebvre², MD, PhD; Claude-Alain Maurage¹, MD, PhD; Charles Duyckaerts³ MD, PhD; Eniko Kovari⁴, MD; Florence Pasquier⁵, MD, PhD; Valérie Buée-Scherrer¹, PhD; Julien Labreuche³, BST; Hélène Behal³, BST; Luc Buée¹, PhD; Claire-Marie Dhaenens¹, PharmD, PhD and Bernard Sablonnière¹, MD, PhD

1. *Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France*

2. *Centre Hospitalier de Wattrelos, Service de Neurologie, Wattrelos, France*

3. *Laboratoire de Neuropathologie Escourolle, AP-HP, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 75013, Paris, France*

4. *Department of Mental Health and Psychiatry, University Hospitals and University of Geneva, 1225, Geneva, Switzerland*

5. *Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1171 - CNR-MAJ, DISTALZ, F-59000 Lille, France*

6. *Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique : épidémiologie et qualité des soins, Département de Statistiques, F-59000 Lille, France*

*Corresponding author: Vincent Huin

INSERM UMR-S 1172, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Bâtiment Biserte, 1, Place de Verdun, F-59045, Lille, France

vincent.huin@inserm.fr

+33 (0)3 20 62 20 75

Key words: PSP, tauopathy, DNA methylation, epigenetic, microtubule-associated protein tau

Funding: This study was supported by the LabEx DISTALZ and the Association PSP France.

Abstract:

Background: Progressive supranuclear palsy (PSP) is a rare neurodegenerative disease causing parkinsonian symptoms. Altered DNA methylation of *MAPT* (microtubule-associated protein tau) correlates with expression changes in Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) brains. However, few studies examine sequences beyond the constitutive promoter.

Objectives: As activating different *MAPT* control regions via methylation might regulate the differential tau expression constituting the specific signatures of individual tauopathies, we compared methylation of a candidate promoter, intron 0.

Methods: We assessed DNA methylation in the brains of patients with different tauopathies (35 AD, 10 corticobasal degeneration and 18 PSP) and 19 controls by intron 0 pyrosequencing. We also evaluated methylation in an independent cohort of 11 PSP cases and 12 controls. Frontal (affected by tau pathology) and occipital (unaffected) cortices were analyzed.

Results: In the initial samples, CpG1 in intron 0 showed significant hypomethylation in PSP-affected frontal cortices compared with controls ($P=0.022$). Such hypomethylation was observed in replicate samples but not in occipital cortices or other tauopathies. PSP and control samples (combining the initial and replicate samples) remained significantly different after adjustment for potential confounding factors (age, H1/H1 diplotype) ($P=0.0005$). PSP-affected tissues exhibited *MAPT* mRNA hyperexpression compared with controls ($P=0.004$), though no correlation with CpG1 methylation was observed.

Conclusions: This exploratory study suggests that regions other than the constitutive promoter may be involved in *MAPT* regulation in tauopathies and *MAPT* intron 0 hypomethylation may be a specific epigenetic signature of PSP. These preliminary findings require confirmation.

Abbreviations:

AD: Alzheimer's disease

AP: Alternative promoter

CBD: Corticobasal degeneration

CpGI: CpG island

MAPT: Microtubule-associated protein tau

PD: Parkinson's disease

PCR: Polymerase chain reaction

PMI: Post-mortem interval

PSP: Progressive supranuclear palsy

qRT-PCR: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

SD: Standard deviation

SEM: Standard error of the mean

SNP: Single-nucleotide polymorphism

TALE: Transcription activator-like effector

TSS: Transcription start site

Introduction:

Progressive supranuclear palsy (PSP), or Steele–Richardson–Olszewski syndrome, is a rare neurodegenerative disease characterized clinically by vertical supranuclear gaze palsy, postural instability, bradykinesia, behavioral modifications and cognitive decline.¹⁻³ This disorder belongs to the tauopathies, a group of neurodegenerative diseases defined by abnormal aggregation of hyperphosphorylated tau protein in the brain. In PSP, tau accumulates within neurons as neurofibrillary tangles and in glial cells as tufted astrocytes.⁴ This tau pathology also has a specific pattern of distribution and progression in the brain that correlates with the clinical course. The stereotypical progression of tau accumulation in PSP typically starts in the basal ganglia and motor cortex. Lesions then progress to the brain stem, the entire frontal cortex and the cerebellum.^{5,6} As with many other tauopathies, PSP is more frequent in aged people, with a mean onset age of 63 years.³ Environmental and/or lifestyle factors that potentially contribute to the risk of PSP remain unknown. A genome-wide association study performed on 1114 autopsied cases and 1051 living subjects diagnosed with PSP identified common genetic variations that were highly associated with the disease ($P < 5 \cdot 10^{-8}$) in the genes *STX6*, *EIF2AK3*, *MOBP* and *MAPT*.⁷ The association between *MAPT* (microtubule-associated protein tau) and PSP was first described in 1999. Indeed, a common inversion of 900 kb encompassing a number of genes, including *MAPT*, defines two haplotypes: H1 and H2. The H1 haplotype is more frequent and is significantly over-represented in multiple neurodegenerative diseases, including PSP⁸ and corticobasal degeneration (CBD)⁹ and likely to a lesser extent in Alzheimer's disease (AD) patients without *APOE* $\epsilon 4$ genotype (OR=1.12; $P=0.0005$).¹⁰ In PSP, H1 appears to be the major risk factor, with an odds ratio (OR) of 5.46.⁷ In the background of this H1 clade, the H1c sub-haplotype, defined by the A allele of the single-nucleotide polymorphism (SNP) rs242557 (located in intron 0 of *MAPT*), is highly associated with PSP^{10,11} and with elevated expression of *MAPT*.¹² Despite the information accumulated to date, the pathophysiological mechanisms underlying these risk factors remain unclear. Epigenetic changes in neurodegenerative diseases have recently begun to attract attention. Changes in DNA methylation are well known to correlate with aging.¹³ Moreover, Li and collaborators recently proposed that the increased risk of PSP due to the H1 haplotype could largely be explained via differential methylation at the *MAPT* locus.¹⁴ *MAPT* has previously been explored in AD¹⁵ and PD,¹⁶ whereby altered DNA methylation of *MAPT* was associated with abnormal gene expression in patients' brains. These two studies assessed the DNA methylation of the main CpG island (CpGI) of *MAPT*, which encompasses the large, non-coding exon 0. However, few studies have examined genomic regions other than the *MAPT* constitutive promoter,¹⁷ and it is now expected that DNA methylation at intragenic CpGIs may regulate the use of alternative intragenic promoters.¹⁸ DNA methylation at these sites may increase chromatin accessibility to binding factors and transcription initiation factors, which may therefore affect transcription (for review, see Kulis M et al. 2013¹⁹). Our hypothesis is that DNA methylation-based activation of different control regions of *MAPT* may be a key factor in the differential tau expression that constitutes the specific signature of each tauopathy. To investigate a new *MAPT* regulatory sequence specific to PSP brains, we assessed DNA methylation of a candidate region in autopsied brains of PSP patients compared with other tauopathies and controls. We searched for regions in *MAPT* that exhibit accumulation of epigenetic marks compatible with enhancer or promoter functions. We compared DNA methylation in frontal cortices with neurofibrillary degeneration to occipital samples without pathological tau from the same patients.

Patients and Methods:

Human brain tissue samples

Brain tissue samples were obtained from the brain banks of clinical centers in Lille, Paris and Geneva, according to the procedures of the local ethics committees. Dissection and diagnosis were conducted by trained neuropathologists and confirmed by Western blotting using phospho-specific tau antibodies to reveal pathological tau proteins. Initially, this study included 19 control individuals and 63 patients (35 AD, 10 corticobasal degeneration (CBD) and 18 PSP). To replicate the main DNA methylation results, an independent cohort of 12 controls and 11 PSP brains from a Paris clinical center was added. Controls were defined as individuals with no signs of cognitive decline, previous stroke, or chronic brain pathology, with Braak stages of 0 to 2. Patients with multiple neurodegenerative diseases were excluded. Subjects with a post-mortem interval (PMI) greater than 48 hours, age at death of less than 40 years or a history of brain tumors, intracranial bleeding or inflammatory brain disease were also excluded from the sampling. Frontal and occipital cortices were dissected for analysis. The main clinical, neuropathological and genetic features of the included subjects are described in Table 1.

DNA and RNA extraction

We excised 200 mg of gray matter from the frontal lobe (Brodmann area 10) ($n=105$) and from the occipital lobe (Brodmann area 18) ($n=96$). One sample of 50 mg was used for DNA extraction, and another 50 mg was used for RNA extraction. Genomic DNA was obtained by phenol-chloroform extraction. Total RNA was isolated from human brain samples by using the RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was determined based on 28S/18S rRNA readings and on the RNA integrity number (RIN) obtained from an Agilent Bioanalyzer 2100 using the RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Courtaboeuf, France). Only samples with concentration >100 ng/ μ l and RIN ≥ 5 ($n=94$) were retained for subsequent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Supplemental Figure S1).

Pyrosequencing

All DNA samples and methylated genomic DNA controls from the Human Premixed Calibration Standard (EpigenDX, Hopkinton, MA, USA) were subjected to sodium bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. Briefly, 500 ng of bisulfite-treated DNA was amplified by PCR. Quantitative methylation analyses were performed by pyrosequencing using the PyroMark™ MD system (Biotage, Uppsala, Sweden; Qiagen), and results were analyzed with the Pyromark Q24 software (Qiagen). All CpG sites were tested in duplicate using two different bisulfite conversions.

Genotyping

The observed variations in methylation levels were examined and separated based on the H1 haplotype and the sub-haplotype H1c. The H1/H2 haplotype was characterized by the presence of the 238 bp insertion/deletion in *MAPT* intron 9.⁸ Genotyping of SNP rs242557, which defines the H1c sub-haplotype, was performed using standard PCR and sequencing

on an ABI3730 DNA analyzer (Applied Biosystems™, Saint Aubin, France). PCR, sequencing and pyrosequencing primers are listed in Supplemental Table S1.

Quantitative RT-PCR

For each of the 90 RNA samples, 1 µg of total RNA was used to generate cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Saint Aubin, France) with Multiscribe Reverse Transcriptase and random primers. *MAPT* expression levels were determined by qRT-PCR using TaqMan® Gene Expression Assays, TaqMan® Universal PCR Master Mix II, with Uracil-N glycosylase (Life Technologies, San Francisco, CA, USA). TaqMan® assays were used to quantify mRNA levels of *MAPT* (Hs00902194_m1) using *Ubiquitin C (UBC)* (Hs00824723_m1) as the control housekeeping gene. qRT-PCR was performed using an ABI PRISM® 7900 HT instrument (Applied Biosystems™) in triplicate for each sample, according to the manufacturer's protocol. The comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was used to calculate relative expression levels.

Statistical analysis

Major characteristics are described for each study group without statistical comparisons. Qualitative variables are expressed as the number (percentage) for each group. Continuous variables are expressed as the mean (\pm standard deviation (SD)) in cases of normal distribution and as the median (\pm interquartile range) otherwise. The normality of distributions was assessed using histograms and the Shapiro-Wilk test. After pooling all groups, we assessed the pairwise correlations of methylation levels (in frontal and occipital areas separately) at the five CpGs by calculating the Pearson's correlation coefficients. Comparisons of the frontal and occipital methylation levels of the five CpGs between controls and each disease group were performed using analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post-hoc test. Using analysis of covariance, comparisons of methylation levels between PSP and controls were further adjusted for two potential confounding factors (age at death and H1/H1 diplotype) based on prior evidence of an association with PSP. For CpG1, for which frontal methylation levels differed significantly between controls and PSP, a replication analysis was performed using an independent cohort of 11 individuals with PSP and 12 controls; methylation levels were compared using Student's *t* test. Finally, given that hypomethylation is associated with upregulated gene expression, we compared mRNA expression between the controls and diseases using the Mann–Whitney U test. Statistical testing was performed at the two-tailed α level of 0.05. Data were analyzed using the software package SAS, release 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

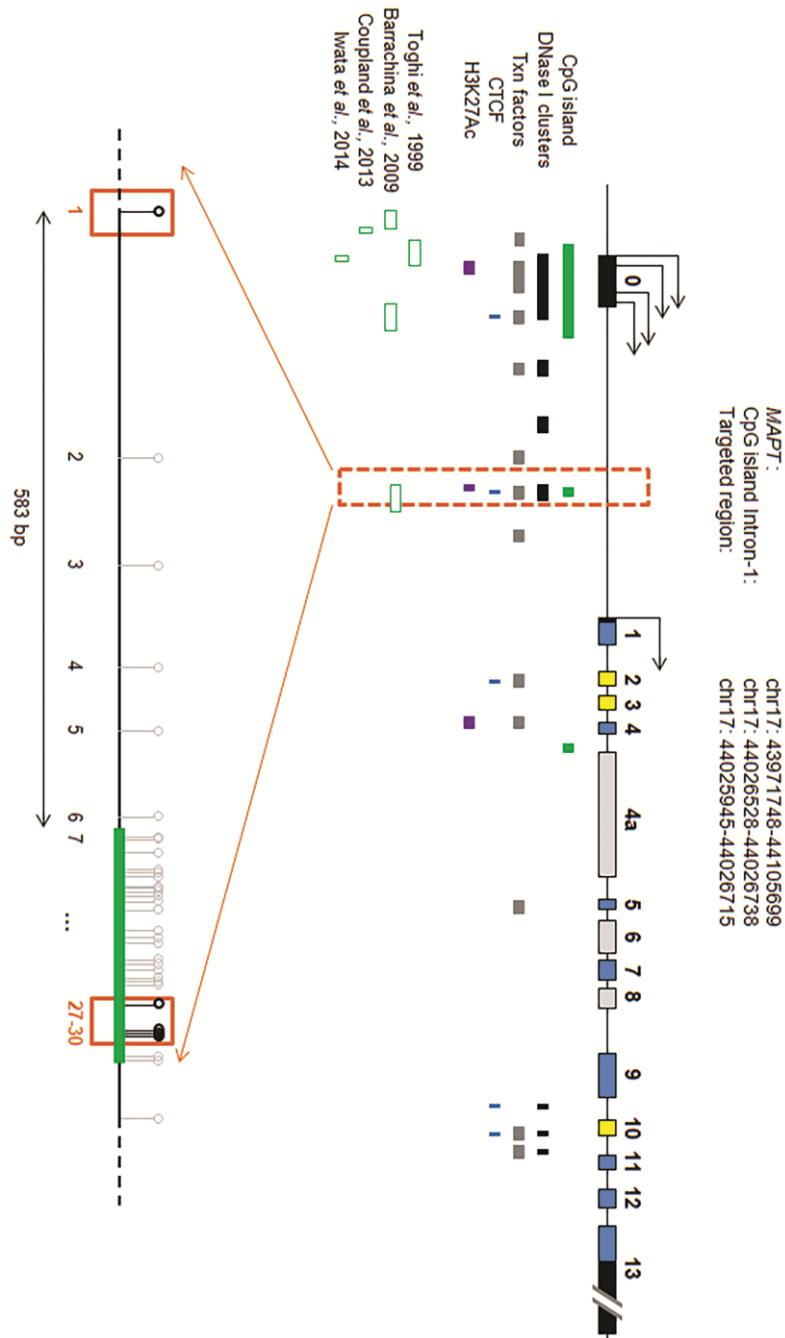


Figure 28 (Article 2, Figure 1) : Schematic diagram of *MAPT* and the position of the different CpG tested in the candidate region.

Untranslated regions are indicated by black boxes, constitutive exons are marked in blue, alternative exons in the brain are marked in yellow, and exons presenting alternative splicing in other tissues are marked in grey. The different transcription initiation sites are depicted by black perpendicular arrows. Regulatory marks from UCSC are shown in colored boxes under the gene. The different regions of *MAPT* assessed for DNA methylation in other studies are marked using empty boxes. White lollipops represent CpGs in the targeted region in intron 0. The five CpGs analyzed were CpGs 1, 27, 28, 29, and 30.

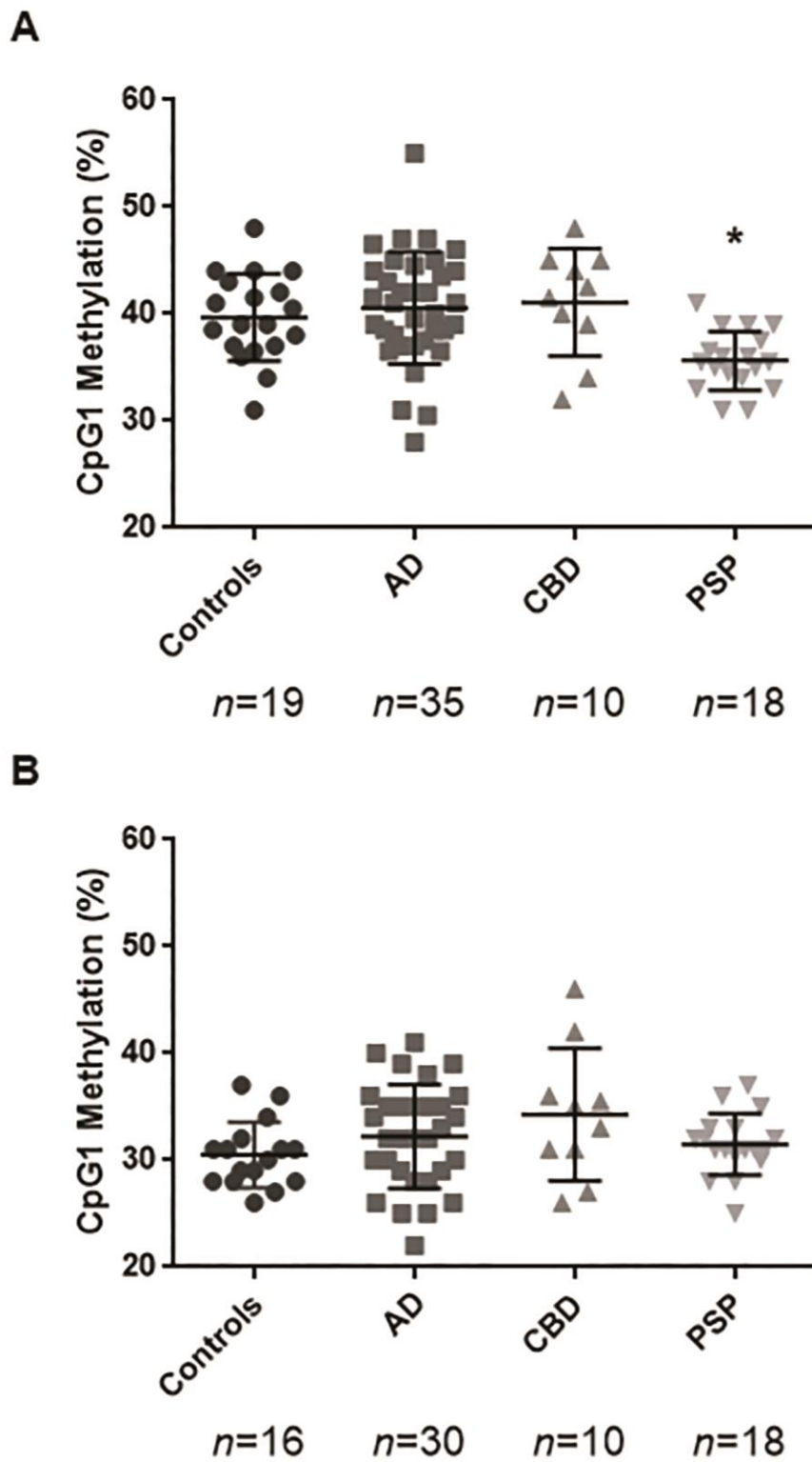


Figure 29 (Article 2, Figure 2) : Comparison of *MAPT* CpG1 methylation levels in the frontal area (A) and in the occipital area (B) between tauopathies and controls.

* $P < 0.05$ for comparison with controls after adjustment for multiple comparisons (Dunnett's test).

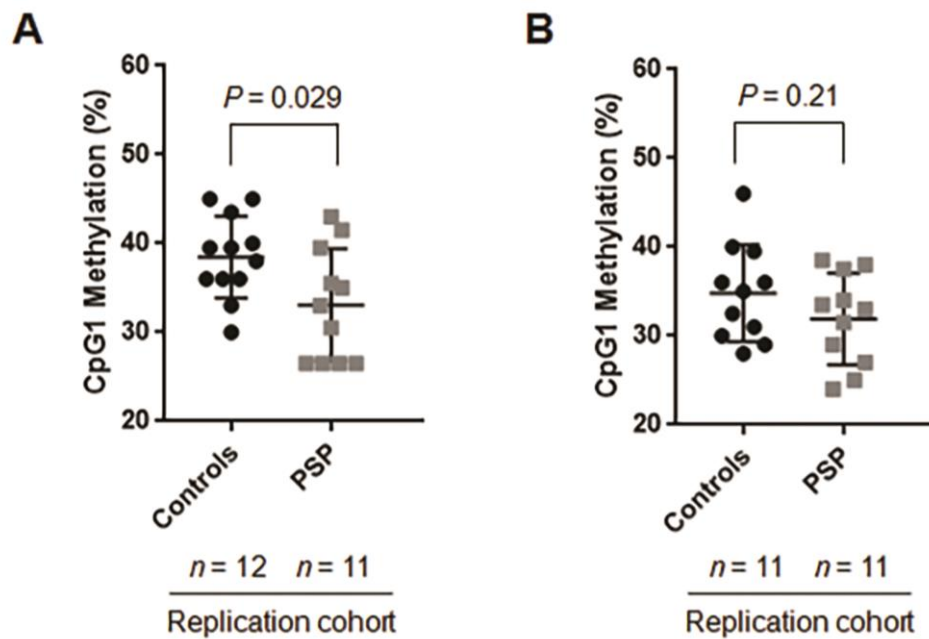


Figure 30 (Article 2, Figure 3) : Replication analysis.

MAPT CpG1 methylation levels in the frontal area (A) and in the occipital area (B) between PSP and controls. *P*-values correspond to comparisons between control and PSP samples using Student's *t* tests.

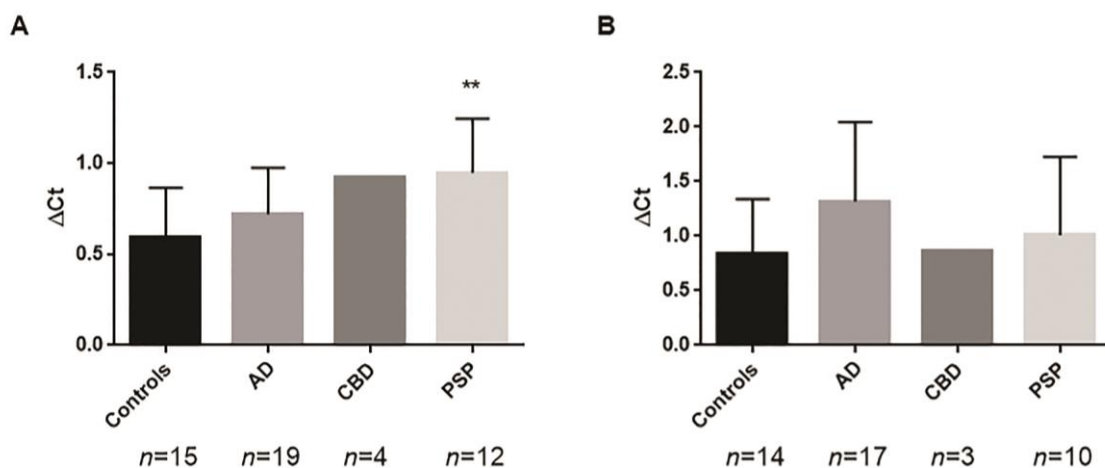


Figure 31 (Article 2, Figure 4) : *MAPT* expression in post-mortem brain based on the frontal area (A) and the occipital area (B) from the studied groups.

The median values and interquartile ranges of *MAPT* expression are reported for the different study groups. No statistical comparison between controls and the CBD group was performed due to the small number of CBD samples with correct RIN. ***P*<0.01 for comparison with controls (Mann–Whitney U test).

Subjects	First cohort				Replicate cohort	
	Controls	AD	CBD	PSP	Controls	PSP
Age of death (year-old)	68.9±16.3	79.0±11.0	71.8±6.4	76.3±7.8	78.6±14.0	74.1±7.7
PMI (h)	15.1±9.2	15.7±12.2	19.8±14.1	19.9±11.3	25.9±12.2	15.8±11.1
Sex Ratio (Men/Women)	3.8 (15/4)	0.8 (16/19)	1.5 (6/4)	1.3 (10/8)	1 (6/6)	1.2 (6/5)
Haplotype H1 of M/APT: n (%)	30 (78.9)	49 (70.0)	13 (65.0)	32 (88.9)	21 (87.5)	18 (81.8)
Diplotype H1/H1: n (%)	11 (57.9)	17 (48.6)	6 (60.0)	14 (77.8)	8 (66.7)	7 (63.6)
Diplotype H1/H2: n (%)	8 (42.1)	15 (42.8)	2 (20.0)	4 (22.2)	3 (25.0)	4 (36.4)
Diplotype H2/H2: n (%)	0 (0)	3 (8.6)	2 (20.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Allele A of rs242557: n (%)	15 (39.5)	26 (37.1)	4 (22.2)	15 (41.7)	7 (35.0)	11 (55.0)

Tableau 7 (Article 2, Table 1) : Main characteristics of the post-mortem cases analyzed in this study.

AD, Alzheimer's disease ; CBD, Corticobasal Dementia ; PSP, Progressive Supranuclear Palsy ; PMI, Postmortem Interval.

Results:

The main characteristics of the two cohorts are described in Table 1, divided by study groups. Several clear differences between groups were observed, with a greater mean age for AD patients, different sex ratios for controls and tauopathy patients, and, as expected, an increased H1/H1 diplotype frequency in PSP patients.

***MAPT* candidate region and CpGs selection**

Epigenetic marks in the *MAPT* gene that could define candidate regions for regulating *MAPT* expression were selected using the GRCh37/hg19 build of the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). A region encompassing the second CpGI in intron 0 and its shores (located between g.44026528 and g.44026738 on chromosome 17) was chosen because it contains several traits representative of a regulatory region, such as a CpGI, clusters of DNase I, transcription factor, and CTCF binding sites and H3K27Ac (Fig. 1). All of these modifications are compatible with an enhancer or a weak promoter. Moreover, this area is located 7 kb downstream of rs242557, the SNP defining the H1c sub-haplotype. The methylation levels of five CpGs were assessed in this region. The first CpG, arbitrarily named CpG1, is located in the CpG shore upstream of the candidate sequence, whereas the other four are located in the CpG island.

Hypomethylation in PSP brains

Methylation was assessed for all five CpGs in the two brain areas for the entire cohort. When all groups were pooled, the methylation levels of the five CpGs correlated positively with each other in the frontal area and in the occipital area. The strongest correlations were identified between CpGs 28 and 30 (all $r > 0.75$, see Supplemental Fig. S2). No significant difference between controls and each tauopathy group was observed for the frontal methylation levels of CpGs 27 and 30 (all $P > 0.23$, see Supplemental Fig. S3). Similarly, no significant difference was observed in occipital samples for the five CpGs. Interestingly, we identified a significant difference in the frontal methylation levels of CpG1 between the controls and PSP group. The mean (\pm SD) CpG1 methylation level in the frontal area was reduced in the PSP group (35.6 ± 2.8 versus 39.7 ± 4.1 in controls, $P = 0.022$), whereas no such difference was observed for CpG1 methylation in the occipital area (31.5 ± 2.9 in PSP versus 30.5 ± 3.1 in controls, $P = 0.85$, Fig. 2). Moreover, no significant difference was observed for CpG1 in frontal or occipital areas between controls and the AD or CBD groups. Thus, methylation analysis revealed DNA hypomethylation in a part of the targeted region of *MAPT* intron 0 only in brain tissue with neurofibrillary degeneration.

The difference in frontal methylation levels of CpG1 between PSP patients and controls remained significant in multivariate analyses adjusted for age at death and H1/H1 diplotype (adjusted means (\pm SEM): 36.2 ± 0.9 versus 39.4 ± 0.8 in controls, $P = 0.012$), whereas the differences in all other comparisons (methylation levels in other CpGs) remained nonsignificant.

Replication analysis of hypomethylation in PSP brains

The replicate samples included 11 PSP brains (mean age at death, 74 ± 8 ; men, 45%; H1/H1 diplotype, 63.6%) and 12 controls (mean age at death, 79 ± 14 ; men, 50%; H1/H1 diplotype, 66.7%). As in the previous analysis, the CpG1 methylation level in the frontal area was

significantly lower in PSP brains (mean±SD, 33.1±6.3) than in control brains (mean±SD, 38.5±4.6; $P=0.029$). No difference was found in the level of CpG1 methylation in the occipital area (Fig. 3). When replicate samples were combined with initial samples, the difference in frontal methylation levels of CpG1 between PSP patients and controls was significant after adjusting for age at death and H1/H1 diplotype, with an adjusted mean difference (PSP vs. controls) of -4.2 (95% CI, -6.4 to -1.9; $P=0.0005$).

Hyperexpression of *MAPT* mRNA in PSP brains

Hypomethylation is associated with upregulation of gene expression. To verify this observation in our cohort, we measured mRNA expression in all samples by qRT-PCR. As shown in Figure 4, *MAPT* expression was significantly increased in PSP patients compared with controls in the frontal area ($P=0.004$) but not in the occipital area ($P=0.65$). Specifically, *MAPT* expression in PSP-affected brain tissues was increased 1.6-fold compared with controls. Although AD patients showed higher *MAPT* expression than controls, this difference did not reach significance for either area ($P=0.077$ in the frontal and $P=0.071$ in the occipital area). However, we found that DNA methylation of CpG1 did not correlate with *MAPT* expression in any of the groups (Supplemental Fig. S4).

Discussion:

The aim of our exploratory study was to assess whether DNA methylation of different and poorly characterized regions of *MAPT* could affect the differential expression of *MAPT* in tauopathies. Our results indicate that methylation of a specific CpG called CpG1 in a novel control region within intron 0 of the *MAPT* gene is associated with PSP. Finally, hypomethylation of intron 0 was associated with increased *MAPT* mRNA expression in PSP-affected brain tissues.

Altered DNA methylation of the *MAPT* gene has previously been investigated in AD,^{12,20} PD¹⁶ and other neurodegenerative diseases.^{15-17,20} Studies on AD, the most prevalent cause of dementia worldwide, assessed *MAPT* methylation in several brain regions that are important in neuropathological process, such as the hippocampus,^{17,21} frontal cortex¹⁷ and temporal cortex.¹⁵ However, considering the disease frequency, the various brain cohorts reported are relatively small. Sanchez et al. compared 25 AD brains with 25 controls,²¹ though Iwata compared as many as 59 AD brains with 76 controls.¹⁵ Regarding the genomic region investigated, most previous studies examining the CpGI encompassing exon 0 and its promoter. More precisely, these studies focused on the core promoter, which extends from approximately 640 bp upstream of the transcription start site (TSS) in exon 0¹⁷ to 211 bp downstream of the TSS²⁰ (Fig. 1). The number of CpGs investigated to date is rather limited (from 1 to 41),^{16,17,21-23} encompassing regions of up to a few hundred base pairs, with significant results observed for 1 to 5 differentially methylated CpGs. For example, Coupland et al.¹⁶ targeted only one SNP (rs76594404) located in the core promoter (291 bp upstream of exon 0) to assess methylation in 28 PD brains versus 12 controls. Although Iwata et al. screened the main CpGI of *MAPT* in 59 AD patients and 76 controls, DNA hypomethylation was observed only in five consecutive CpGs located between 20 and 30 bp after the start of exon 0. Interestingly, Barrachina et al.¹⁷ explored 31 CpGs 54,336 to 54,905 bp downstream of exon 0, in the same region as we investigated, but focused on the CpGI. Their study focused on 2 brain regions (the frontal cortex and hippocampus) from 98 patients who presented with various neurodegenerative diseases including AD ($n=44$) and Pick's disease ($n=3$) compared with 26 controls. The authors found no significant results due to the low precision of the MALDI-TOF technology used. Regarding PSP, the cohorts of post-mortem brains described in the literature are relatively small because of the low prevalence of the disease, which is approximately five to six cases per 100,000 persons.^{3, 24, 25} Indeed, larger cohorts are actually clinicopathological descriptions of as many as 100 cases in multicentric studies.²⁴⁻²⁷ Only one recent study assessed genome-wide DNA methylation in 43 PSP brains (temporal cortex) from 175 PSP cases and compared them with 185 controls.²⁸ In that study, the authors correlated gene expression with methylation data for *MOBP* and confirmed the association of the H1 haplotype with CpG methylation at the *MAPT* locus.

As in previous studies, a major limitation of our exploratory study is the lack of adequate statistical power due to the small sample sizes. In addition, regarding the issue of multiple comparisons (although *P*-values for comparisons of each disease group with controls were adjusted using Dunnett's correction), we cannot exclude the possibility that our primary findings are false positives. However, the difference in CpG1 hypomethylation between PSP and controls was observed using an independent sample of 11 PSP brains and 12 controls as a replication cohort. Further and larger studies are warranted to confirm these preliminary results, which should be considered only as hypothesis-generating research.

We observed a mean difference of 4.1% in CpG1 hypomethylation in PSP-affected brains compared with controls. Although low, this variation is consistent with results obtained in other studies on neurodegenerative diseases using post-mortem brain tissues. Indeed, differences of less than 6% in methylation levels are commonly observed^{15,21,23,29} and can be explained by a mixture of cells with and without methylation in brains.¹⁵ Only a small percentage of the neurons and/or glial cells are affected in brain tissues presenting the hallmark of a neurodegenerative disease. Iwata et al. used transcription activator-like effector (TALE) constructs to confirm that even a small increase (less than 10%) in the methylation level can be associated with altered expression.

MAPT methylation levels were examined in two brain regions that are differently affected by PSP pathology: the frontal cortex, which contains pathological neurofibrillary tangles, and the occipital cortex, which is normally spared in PSP. Our results revealed hypomethylation in the PSP frontal cortex that was not observed in occipital tissues. This observed hypomethylation is therefore specific to the pathological tissue. However, differences between tissues are well known, especially within the human brain. Trabzuni et al. reported an extensive study based on 2011 brain samples from 439 individuals and showed significant regional variations in *MAPT* mRNA expression and splicing.³⁰ In a large study, Gibbs et al. tested 27,578 DNA methylation sites and expression levels of 22,184 genes in four brain regions (the frontal cortex, temporal cortex, cerebellum and pons) from 150 individuals.³¹ The authors correlated genetic variations, DNA methylation and gene expression across the human genome (including variations in *MAPT*). However, many of these correlations differ across the four indicated brain regions. Regarding *MAPT* methylation, regional variations are present in AD as well in PD. Indeed, Iwata et al., observed in the same AD patients differences in *MAPT* methylation between the temporal cortex, an area typically affected by neurofibrillary tangles, and the parietal cortex and the cerebellum, which are typically less affected.¹² Similarly, Coupland et al. reported variations in *MAPT* methylation in the putamen and cerebellum but not the anterior cingulate cortex, in PD subjects.^{15,16} These variations were correlated with the extent of PD pathology in these brain regions.

To investigate the effect of DNA methylation of intron 0, we assessed DNA methylation and *MAPT* mRNA expression in both of the brain regions we examined. We present the first report of over-expression of *MAPT* mRNA in PSP samples in frontal tissues, a phenomenon not observed in other tauopathies. However, we did not observe any correlation between DNA methylation of intron 0 and *MAPT* expression. We hypothesize that *MAPT* expression is regulated by other gene regions and likely depends on the use of a different alternative promoter. The use of these different promoters can be regulated by epigenetic modifications that generate different transcripts and/or interfere with splicing.³² Thus, different tauopathies may involve different epigenetic modifications of *MAPT*, constituting specific epigenetic signatures.

Indeed, the promoter linked to the large CpGI in exon 0 might not be the unique promoter region of *MAPT*.^{33,34} Analysis of *MAPT* transcripts from the literature and databases revealed several alternative TSSs within exon 0 or exon 1 of *MAPT* that might correspond to alternative promoters. More than half of all human genes are regulated by alternative promoters (APs), with an average of 3.1 putative APs per gene.³⁵ AP usage, which has previously been suggested in AD^{36,37}, appears to be a major mechanism for determining the regional differences in gene expression during old age.³⁸ This regulation of APs is controlled

by intragenic DNA methylation.^{39,40} For example, DNA demethylation of intragenic CpGs may result in use of the alternative downstream promoter via releasing methyl binding domains (MBDs), facilitating transcription factor binding and/or DNA looping to a distal enhancer.¹⁹ Moreover, AP regulation may also explain the variability in brain regions affected in tauopathies. Indeed, AP usage is highly tissue specific.^{35,38,40} Notably, the brain is the tissue containing the second largest number of tissue-specific putative APs.³⁵ Thus, AP dysregulation of many genes, such as *MAPT*, may be involved in the physiopathology of a number of neurodegenerative diseases. Our study demonstrating an alteration of DNA methylation in PSP patients in an intragenic region of *MAPT* reinforces this hypothesis.

We present convergent data (hypomethylation, mRNA overexpression, disease and region specificity) indicating that epigenetic changes may be involved in PSP. Altogether, our results emphasize the importance of this control region in intron 0 in PSP physiopathology. Our findings also demonstrate the involvement of multiple *MAPT* regions in tauopathies. Additional investigations of DNA and RNA levels using a larger cohort will be necessary to assess the roles of these epigenetic signatures in the transcriptional deregulation of *MAPT* in PSP and other neurodegenerative diseases.

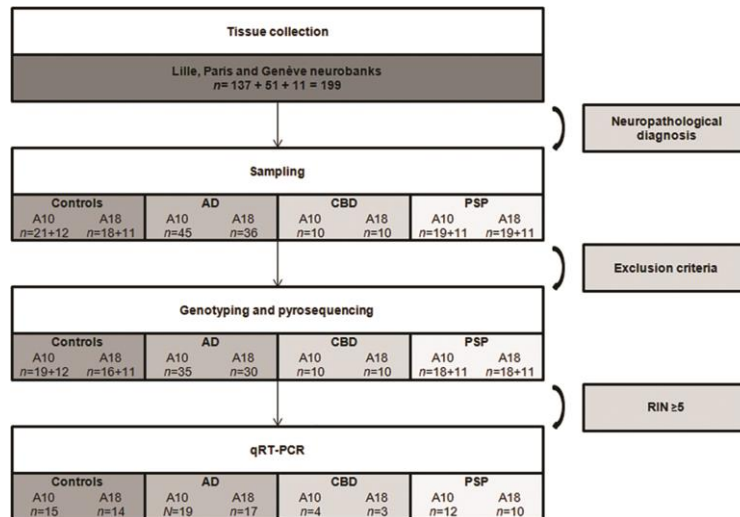


Figure 32 (Article 2, Supplemental Figure S1) : Timeline of analyses on post-mortem brains.

For each group, controls or patients, the number of samples tested in this study is indicated for the frontal samples (A10) and the occipital samples (A18). For the controls and the PSP group, the two numbers represent the respective numbers of samples from the first and second cohorts.

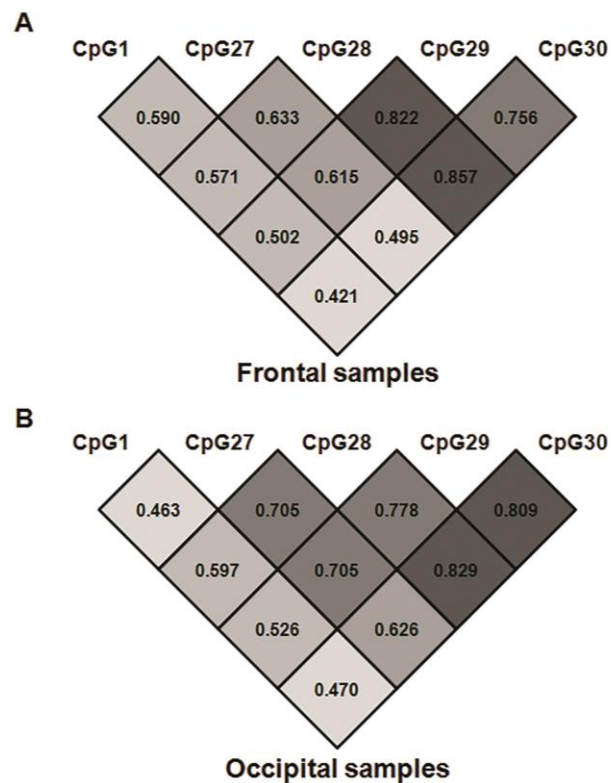


Figure 33 (Article 2, Supplemental Figure S2) : Plots of the Pearson correlations of the methylation levels of the five CpGs tested.

The figure shows the r values for each pair of CpGs and for the frontal samples, $n=82$ (A) and the occipital samples, $n=77$ (B). Note that methylation of all the CpGs had a significant positive correlation, but a stronger correlation was observed between CpG 28 and 30, with $r > 0.75$. Numbers in the figure indicate r -values ($P < 0.001$).

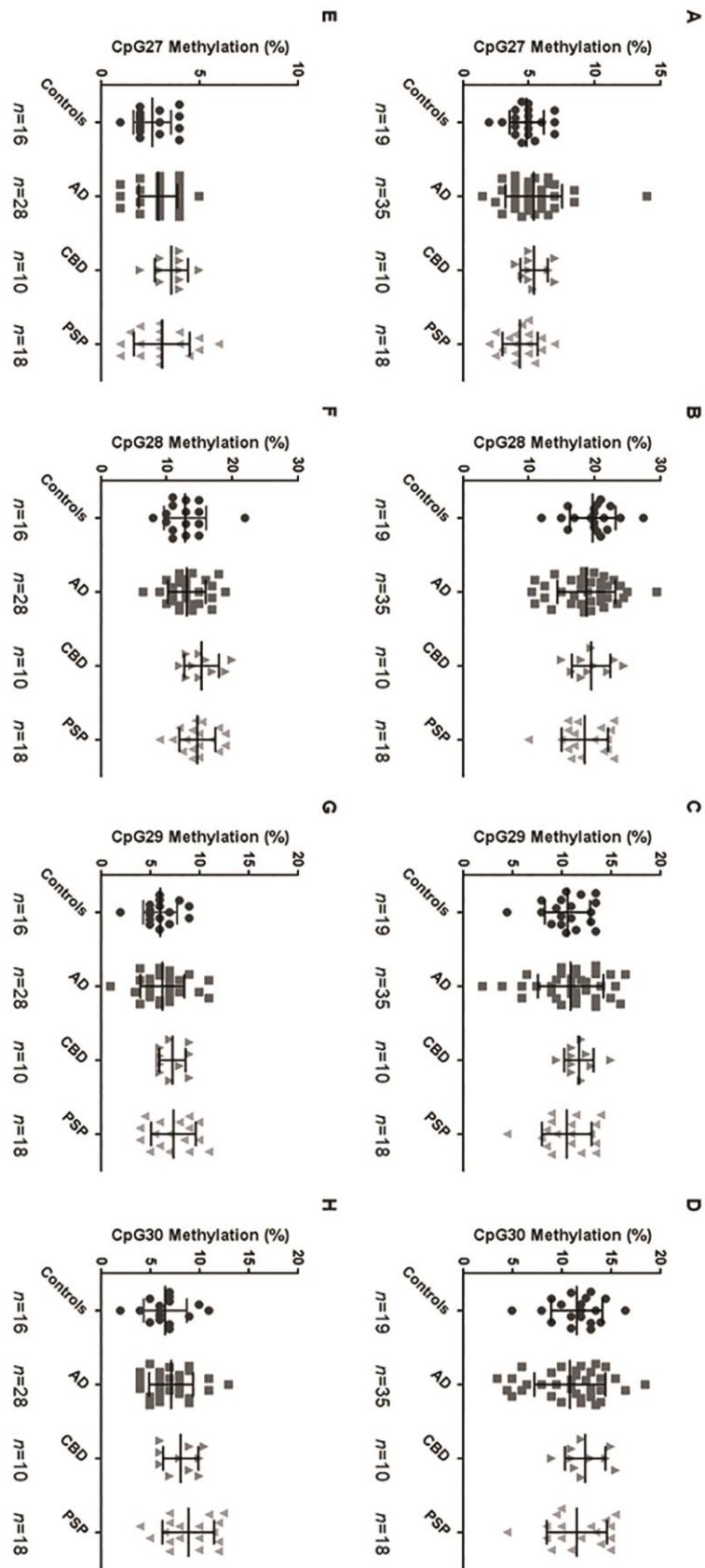


Figure 34 (Article 2, Supplemental Figure S3) : Comparison of *MAPT* methylation levels in the frontal area (A) and in the occipital area (B) between tauopathies and controls.

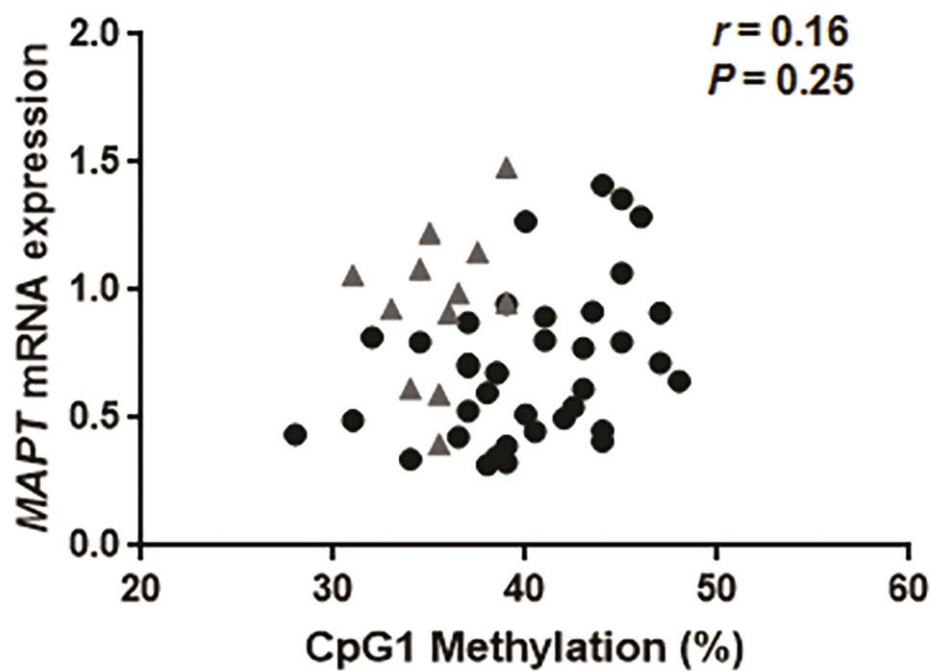


Figure 35 (Article 2, Supplemental Figure S4) : CpG1 methylation levels and *MAPT* mRNA expression.

The figure shows the correlation of CpG1 methylation levels and *MAPT* qRT-PCR results for the frontal samples ($n=50$). PSP samples are depicted by grey triangles.

Primer name	Size (bp)	Forward primer	Reverse primer	Sequencing primer
a. <i>MAPT H1/H2 genotyping:</i> Int9-del-238	246 - 484	5'-GGAAGACGTTCTCACTGATCTG-3'	5'-AGGAGTCTGGCTTCAGTCTCTC-3'	
b. <i>MAPT H1c genotyping:</i> rs242557	293	5'-GAACATGCACATTTCTGCAAC-3'	5'-AATGCTGGGAAGCAAAGAA-3'	
c. <i>Pyrosequencing:</i> Int-1.CpG1	155	5'-AAGGAGAAAGTTTTTTAGGAAAT-3'	5'-BIO-AAACTTCAAAACCCAAACATCC-3'	5'-AGTTATTGTTTGATTTAATT-3'
Int-1.CpG34-37	181	5'-GGGATTTTTTTGGTTGTTTTTA-3'	5'-BIO-AAAATCAAAAATCCAAAACTCA-3'	5'-GGATTTAGATTGGAAGT-3'

Tableau 8 (Article 2, Supplemental S1) : List of primers.

Acknowledgements:

We acknowledge Amélie Labudeck for her technical contribution, Patrick Gelé as engineer in charge of the Lille brainbank and Sabrina Leclère as engineer in charge of the Paris brainbank. We thank Samuel Malone for his valuable contribution to the translation of this publication.

References:

1. Boeve BF. Progressive supranuclear palsy. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18 Suppl 1:S192-194.
2. Williams DR, Lees AJ. Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges. *Lancet Neurol* 2009;8(3):270-279.
3. Golbe LI. Progressive supranuclear palsy. *Semin Neurol* 2014;34(2):151-159.
4. Hauw JJ, Verny M, Delaere P, Cervera P, He Y, Duyckaerts C. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci Lett* 1990;119(2):182-186.
5. Hof PR, Delacourte A, Bouras C. Distribution of cortical neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy: a quantitative analysis of six cases. *Acta Neuropathol* 1992;84(1):45-51.
6. Hauw JJ, Daniel SE, Dickson D, et al. Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy). *Neurology* 1994;44(11):2015-2019.
7. Hoglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet* 2011;43(7):699-705.
8. Baker M, Litvan I, Houlden H, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999;8(4):711-715.
9. Houlden H, Baker M, Morris HR, et al. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 2001;56(12):1702-1706.

10. Pastor P, Moreno F, Clarimon J, et al. MAPT H1 Haplotype is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease Risk in APOE ϵ 4 Noncarriers: Results from the Dementia Genetics Spanish Consortium. *J Alzheimers Dis* 2015;49(2):343-352.
11. Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, et al. Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Med Genet* 2005;42(11):837-846.
12. Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, et al. The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis* 2007;25(3):561-570.
13. Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, et al. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet* 2011;20(6):1164-1172.
14. Li Y, Chen JA, Sears RL, et al. An epigenetic signature in peripheral blood associated with the haplotype on 17q21.31, a risk factor for neurodegenerative tauopathy. *PLoS Genet* 2014;10(3):e1004211.
15. Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, et al. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet* 2014;23(3):648-656.
16. Coupland KG, Mellick GD, Silburn PA, et al. DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E in vitro. *Mov Disord* 2014;29(13):1606-1614.
17. Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68(8):880-891.
18. Yu CE, Cudaback E, Foraker J, et al. Epigenetic signature and enhancer activity of the human APOE gene. *Hum Mol Genet* 2013;22(24):5036-5047.

19. Kulis M, Queiros AC, Beekman R, Martin-Subero JI. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013;1829(11):1161-1174.
20. Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Ukitsu M, Genda Y. The methylation status of cytosines in a tau gene promoter region alters with age to downregulate transcriptional activity in human cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1999;275(2):89-92.
21. Sanchez-Mut JV, Aso E, Heyn H, et al. Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA-dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 2014;24(4):363-368.
22. Pihlstrom L, Berge V, Rengmark A, Toft M. Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the alpha-synuclein gene. *Mov Disord* 2015;30(4):577-580.
23. Chang L, Wang Y, Ji H, et al. Elevation of peripheral BDNF promoter methylation links to the risk of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014;9(11):e110773.
24. Caparros-Lefebvre D, Golbe LI, Deramecourt V, et al. A geographical cluster of progressive supranuclear palsy in northern France. *Neurology* 2015;85(15):1293-1300.
25. Horvath J, Burkhard PR, Bouras C, Kovari E. Etiologies of Parkinsonism in a century-long autopsy-based cohort. *Brain Pathol* 2013;23(1):28-33.
26. Koga S, Josephs KA, Ogaki K, et al. Cerebellar ataxia in progressive supranuclear palsy: An autopsy study of PSP-C. *Mov Disord* 2016;31(5):653-662.
27. Respondek G, Stamelou M, Kurz C, et al. The phenotypic spectrum of progressive supranuclear palsy: a retrospective multicenter study of 100 definite cases. *Mov Disord* 2014;29(14):1758-1766.

- 28.** Allen M, Burgess JD, Ballard T, et al. Gene expression, methylation and neuropathology correlations at progressive supranuclear palsy risk loci. *Acta Neuropathol* 2016.
- 29.** Foraker J, Millard SP, Leong L, et al. The APOE gene is differentially methylated in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015;48(3):745-755.
- 30.** Trabzuni D, Wray S, Vandrovцова J, et al. MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet* 2012;21(18):4094-4103.
- 31.** Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, et al. Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. *PLoS Genet* 2010;6(5):e1000952.
- 32.** Kornblihtt AR. Chromatin, transcript elongation and alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13(1):5-7.
- 33.** Caillet-Boudin ML, Buee L, Sergeant N, Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener* 2015;10:28.
- 34.** Andreadis A. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739(2-3):91-103.
- 35.** Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 2006;16(1):55-65.
- 36.** Twine NA, Janitz K, Wilkins MR, Janitz M. Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011;6(1):e16266.

- 37.** Drzewinska J, Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M. Identification and analysis of the promoter region of the human DHCR24 gene: involvement of DNA methylation and histone acetylation. *Mol Biol Rep* 2011;38(2):1091-1101.
- 38.** Pardo LM, Rizzu P, Francescatto M, et al. Regional differences in gene expression and promoter usage in aged human brains. *Neurobiol Aging* 2013;34(7):1825-1836.
- 39.** Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 2010;466(7303):253-257.
- 40.** Cheong J, Yamada Y, Yamashita R, et al. Diverse DNA methylation statuses at alternative promoters of human genes in various tissues. *DNA Res* 2006;13(4):155-167.

IV- Résultats complémentaires

Hypométhylation et facteurs de confusion

Nous nous sommes assuré que les variations de méthylation observées étaient bien associées à la pathologie et non, à d'autres facteurs génétiques et/ou démographiques pouvant constituer de potentiels facteurs de confusion. Nous avons donc testé sur l'ensemble des échantillons frontaux de la première cohorte, les associations entre le niveau de méthylation de CpG1 et différents facteurs de confusion potentiels : le diplotype H1/H2 de *MAPT*, l'âge au décès, le sexe, le PMI et l'allèle A du SNP rs242557.

Seul le diplotype H1/H2 et l'âge au décès se sont révélés associés à une hypométhylation de CpG1 (Figure 36 A et B). Le taux de méthylation de CpG1 dans la région frontale était plus faible chez les sujets ayant les diploypes H1/H1 (37,8 % ± 5,0) par rapport aux sujets avec les diploypes H1/H2 ou H2/H2 (47,1 % ± 3,7) (test T de Student : $p < 0,001$). Les sujets possédant le diplotype H1/H1 présentaient un niveau de méthylation de CpG1 réduite de 3,9 % par rapport aux sujets avec H1/H2 ou diploypes H2/H2. De plus, la méthylation de CpG1 baisse avec l'âge au décès (corrélation de Pearson : $r = -0,25$, $p = 0,025$). Le niveau de méthylation CpG1 diminue ainsi d'environ 1 % tous les 10 ans. Ces deux facteurs avaient été évoqués par l'analyse de la littérature (Li *et al.*, 2014; Hernandez *et al.*, 2011) et le taux de méthylation de CpG1 a donc été ajusté sur ces deux facteurs.

Nous n'avons pas observé d'association entre le taux de méthylation de CpG1 et le sexe, le PMI ou l'allèle A du SNP rs242557 (Figure 36 C, D et E). L'ajustement réalisé avec les seuls facteurs diplotype H1/H2 et âge au décès était donc bien adapté.

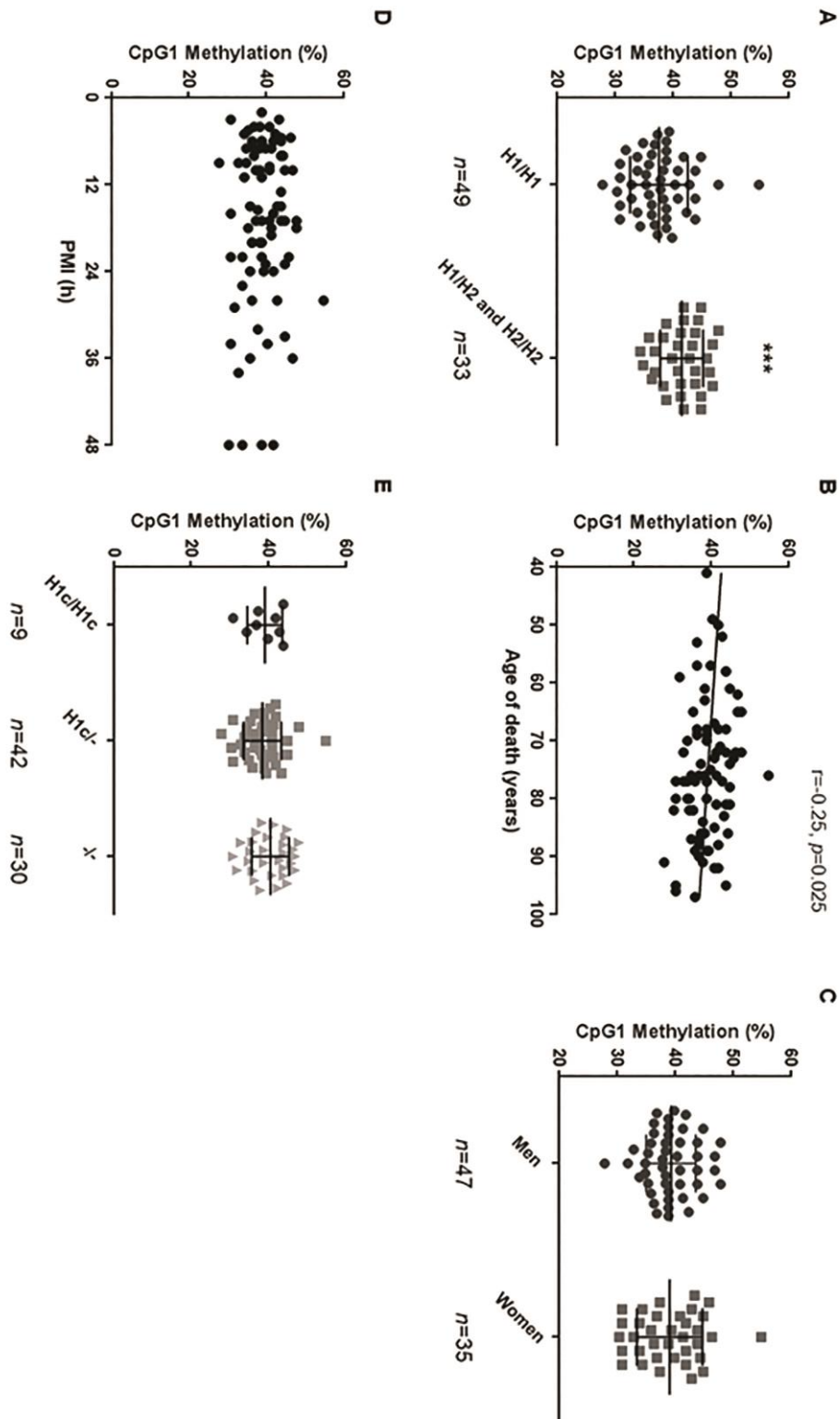


Figure 36 : Méthylation de CpG1 et facteurs de confusion.

Association des niveaux de méthylation de CpG1 dans les régions frontale avec le diplotype H1/H1 (A), l'âge au décès (B), le sexe (C), PMI (D) et le génotype de rs242557 (E) dans tous les groupes mis en commun. *** $P < 0,001$ pour la comparaison entre H1/H1 et (H1/H2 + H2/H2) diplotypes (t-test de Student).

Chapitre 3 : Promoteur alternatif de *MAPT*

I- Introduction

Contexte de l'étude

L'utilisation de promoteurs alternatifs a été mise en évidence dans un nombre croissant de gènes, et plus particulièrement dans le cerveau, où jusqu'à 60 % des gènes sont concernés (Pardo *et al.*, 2013). Ces promoteurs alternatifs des gènes est, avec l'épissage alternatif, une source importante de diversité du transcriptome et un mécanisme important de la régulation génique. Dans la majorité des cas, ces promoteurs alternatifs produisent des ARNm qui diffèrent uniquement par leurs expressions et leurs séquences 5'UTR, sans modifier les séquences codantes des transcrits. Cependant, l'utilisation de ces promoteurs alternatifs peut aussi aboutir à la synthèse de protéines qualitativement différentes pouvant affecter leur fonction ou leur localisation subcellulaire (pour revue : (Landry *et al.*, 2003)). Fait intéressant, épissage et promoteurs alternatifs semblent également être couplés. Pour certains gènes, le choix du promoteur détermine l'inclusion ou l'exclusion d'un exon alternatif (Pecci *et al.*, 2001; Logette *et al.*, 2003). De plus, les modifications post-traductionnelles des histones et la longueur du premier exon des gènes peuvent modifier la vitesse de l'ARN polymérase II et l'épissage des gènes (Bieberstein *et al.*, 2012). Il en résulte que l'architecture des gènes, leur épissage, les marques épigénétiques et leur transcription sont étroitement liés.

Une augmentation significative de la diversité du transcriptome humain a été observée dans certaines conditions pathologiques et notamment dans le tissu cérébral des patients souffrant de MA. L'analyse du transcriptome effectuée par Twine et collaborateurs a ainsi révélé de nombreuses altérations dans l'expression génique et l'épissage dans les régions cérébrales affectées par la MA. Cette diversité serait liée à des altérations de l'épissage alternatif et à l'utilisation de promoteurs alternatifs (Twine *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2013). Plusieurs gènes important impliqués dans le développement de la MA présentent des promoteurs alternatifs. Par exemple, le gène *PSEN2* qui code la préséniline-2 et dont les mutations sont responsables de formes autosomiques dominantes de MA, possède deux promoteurs qui permettent la transcription d'ARNm qui diffèrent dans leur région 5'UTR (Renbaum *et al.*, 2003; Ounallah-Saad *et al.*, 2009). Le gène *APOE*, qui code l'apolipoprotéine E et qui correspond également au principal facteur de risque génétique

connu de la MA, est transcrit selon trois isoformes différentes dans le lobe temporal et l'une de ces isoformes est générée par un promoteur alternatif en 5' du deuxième exon. Dans le lobe temporal de patients atteints de MA, l'expression de l'ensemble des ARNm d'*APOE* est globalement diminuée, mais il existe aussi une répartition différente entre les 3 isoformes d'*APOE* signant l'existence d'un switch dans l'utilisation des différents promoteurs du gène (Twine *et al.*, 2013).

Les précédents résultats de l'analyse du taux de méthylation de l'ADN de l'intron 0 de *MAPT* nous ont conduits à nous interroger sur le rôle potentiel du promoteur alternatif non décrit du gène *MAPT* localisé en 5' de l'exon 1. En effet, l'existence d'un promoteur alternatif du gène *MAPT* pourrait expliquer les différences observées dans l'expression des transcrits de *MAPT* selon les tissus et les facteurs de transcription (Andreadis, 2005). De plus, la présence de transcrits débutant à l'exon 1 témoigne également de la présence d'un promoteur alternatif de *MAPT* en 5' de l'exon 1 (Caillet-Boudin *et al.*, 2015). Ce promoteur alternatif serait d'autant plus intéressant qu'il pourrait expliquer l'agrégation de certaines isoformes protéiques dans les différentes tauopathies.

Par la suite, nous emploierons le terme de "promoteur A", pour désigner le promoteur constitutif, situé en amont de l'exon 0. Le promoteur alternatif situé en amont de l'exon 1 sera dénommé "promoteur B".

Objectif de l'étude

Notre hypothèse est que ce promoteur alternatif est activé en conditions pathologiques et pourrait être responsable de l'expression de transcrits plus courts débutant à l'exon 1. Notre objectif visait donc à caractériser ce promoteur alternatif en 5' de l'exon 1 du gène *MAPT* et de démontrer que celui-ci est fonctionnel dans le cerveau de patients atteints de tauopathies.

Résultats

Les résultats préliminaires de ce travail sont présentés ci-dessous. Ils font l'objet d'un manuscrit en préparation. Brièvement, nous avons tout d'abord réalisé une analyse bioinformatique du promoteur alternatif putatif en 5' de l'exon 1 de *MAPT*. Puis, nous avons étudié par 5'RACE les différents transcrits de *MAPT* dans le cerveau de témoins et patients atteints de MA ou de PSP. Nous avons ainsi pu cloner plusieurs transcrits débutant à l'exon 1. Par la suite, nous avons cloné les promoteurs de *MAPT* en 5' de l'exon 0 (promoteur A) et en 5' de l'exon 1 (promoteur B) dans un plasmide pGL3 Basic (Promega)

exprimant la luciférase sous le contrôle de ces régions promotrices. Les analyses de l'activité de ces deux régions promotrices est en cours de réalisation. De façon intéressante, nous avons également observé par qRT-PCR que les ARNm de *MAPT* issus des deux promoteurs sont dérégulés, conduisant à expression plus importante des ARNm issus du promoteur B dans le tissu cérébral des patients atteints de PSP et de MA par rapport aux témoins sains. Nous observons aussi des anomalies de l'épissage des transcrits de petites tailles par rapport aux autres ARNm de *MAPT*.

En conclusion, notre étude démontre l'existence d'ARNm issus du promoteur "B" dans le cerveau humain. De plus, nous démontrons que l'activation de ce promoteur alternatif aboutit à la transcription d'ARNm plus courts codant pour des protéines tau particulières qui pourraient être impliquées dans la survenue des tauopathies.

II- Résultats complémentaires : Etude d'un promoteur alternatif du gène *MAPT* dans les tauopathies

Analyse bioinformatique

Nous avons réalisé une analyse bioinformatique de la région de l'exon 1 du gène *MAPT*. Pour cela, nous avons analysé la séquence de l'exon 1 ainsi que les 2 kb en 5' et les 300 pb en 3' du premier nucléotide de l'exon 1 qui correspond dans les bases de données au site d'initiation de transcription de certains transcrits de *MAPT*. Les 2300 pb ont été analysées avec les logiciels FPROM, TSSW et Promoter 2.0 Prediction Server pour rechercher un promoteur. Nous avons aussi utilisé les logiciels MATCH 1.0, P-MATCH 1.0, RSAT, Nsite et GPMiner pour identifier les éventuels sites d'hybridation de facteurs de transcription.

L'analyse bioinformatique n'a pas été très concluante pour retrouver un promoteur dans la séquence soumise. Seul le logiciel Promoter 2.0 Prediction Server a permis de retrouver trois possibles régions promotrices dans les 2300 pb. A noter que l'une de ces régions promotrices prédites correspond au premier nucléotide de l'exon 1, mais avec une probabilité faible. Le logiciel GPMiner n'a pas retrouvé de TATA box, ni de CCAAT box qui constituent des séquences caractéristiques de nombreux promoteurs. Par contre, il existe une GC box localisée entre 136 à 141 pb en 5' de l'exon 1. Les différentes prédictions de sites d'hybridation de facteurs de transcription sont à considérer avec précaution, car les différents logiciels utilisés ont permis de d'obtenir 25 sites putatifs. Cependant nous notons une accumulation très intéressante de 6 sites putatifs de facteurs de transcription (Evi-1, HNF-4, COUP-TF, E2F, C/EBP et YY1) dans une région de 50 pb centrée sur le premier nucléotide de l'exon 1.

Test de l'activité des promoteurs

Clonage des promoteurs A et B de *MAPT*

Nous avons étudié la fonctionnalité du promoteur B en clonant la région promotrice putative dans un vecteur d'expression pGL3 Basic (Promega) exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle de la séquence insérée. Nous avons aussi cloné comme témoin positif le promoteur A du gène *MAPT*. Brièvement, nous avons tout d'abord amplifié les séquences d'intérêt par long-range PCR. Pour ces deux clonages, l'ADN génomique issu de sang d'un témoin ayant un diplotype H1/H2 a été utilisé comme matrice des deux long-range PCR. Les séquences génomiques amplifiées correspondait à (ii) la séquence comprise entre

les 1509 pb en 5' de l'exon 0 et les 302 premières pb de l'exon 0 pour le promoteur A (amorces Promoteur.A.F : AGGTCTTGAAGTAGGATGGTGGC et Promoteur.A.R : GATAGTCGACAGAGGCGAGGAC) et (ii) comprise entre les 1879 pb en 5' de l'exon 1 et les 121 premières pb de l'exon 1 pour le promoteur B (amorces Promoteur.B.F : GCCTGTCCTGGAATTTACATCAC et Promoteur.B.R : TGGTCTTGGTGCATGGTGTAGC). Les produits de PCR obtenus ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Enfin, nous avons réalisé le clonage des produits de long-range PCR en utilisant le kit In-Fusion® HD cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). Les plasmides obtenus ont été extraits en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid No Lid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) puis séquencés par l'entreprise GATC Biotech (Zurich, Suisse).

Activité luciférase des promoteurs

Des cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits dans 250 ml de milieu jusqu'à (30 à 40% de confluence). Les jours suivants, à 70% de confluence, les cellules ont été transfectées avec 250 ng / puits de plasmides en utilisant le kit FuGene HD (Promega). Après transfection, les cellules ont été cultivées pendant 48 h supplémentaires à 33 °C, puis nous avons mesuré l'activité luciférase en utilisant le système Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) sur un appareil Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) conformément aux instructions du kit. Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois, lors de trois nouvelles mises en culture de cellules HeLa avec à chaque fois au moins trois échantillons par conditions et par passage. Nous avons transfecté un plasmide pGL3 Basic (Promega) sans insert comme témoin négatif et avons soustrait les intensités de fluorescence obtenue avec ce plasmide vide aux autres transfections avec les promoteurs. Enfin, nous avons rapporté la luminescence de chaque construction (pGL3-Promoteur.A et pGL3-Promoteur.B) à celle d'un plasmide pGL3-SV40 (Promega).

Les expériences de luciferase reporter assay pour mesurer l'activité des promoteurs A et B de *MAPT* sont actuellement en cours de réalisation.

Altération de l'expression dans le cerveau humain

Matériels et méthodes

L'ensemble des qRT-PCR a été réalisé sur les échantillons présentant un RIN > 5, conformément aux recommandations de la littérature (Fleige *et al.*, 2006). Lors de ces analyses, les patients MA ont été séparés dans un second temps en deux sous-groupes : (i) groupe de MA présentant un stade de Braak 3 ou 4 et qui présentaient une pathologie tau uniquement dans le cortex frontal; (ii) groupe de MA présentant un stade de Braak 5 ou 6 et qui présentaient une pathologie tau dans le cortex frontal et le cortex occipital. Au total, nous avons étudié les échantillons d'ARN cérébraux issus des régions frontales chez 17 témoins, 20 MA (dont 5 de stade Braak 3-4 et 15 MA de stade de Braak 5-6), 4 DCB, 13 PSP et 6 Pick. Dans le cas des échantillons de cortex occipital, nous avons analysé 15 témoins, 17 MA (dont 5 de stade Braak 3-4 et 12 MA de stade de Braak 5-6), 3 DCB, 10 PSP et 4 Pick. A noter que, les groupes de malades DCB et Pick étant d'effectifs trop faibles, ils n'ont pas été pris en compte lors de l'analyse statistique. Leurs résultats semblent toutefois être similaires à ceux des patients Alzheimer avec un stade de Braak 5-6.

Comme dans l'article sur la méthylation de l'ADN, 1 µg d'ARN total a été utilisé pour générer des ADN complémentaires (ADNc) en utilisant le kit High-Capacity cDNA reverse transcriptase (Applied Biosystems™, France). Les niveaux d'expression des ARNm de *MAPT* ont été évalués par qRT-PCR quantitative fluorescente (TaqMan®) en utilisant le mastermix TaqMan® Gene Expression Assays, TaqMan® Universal PCR Master Mix II, avec uracile-N-glycosylase (Life Technologies, CA, USA). Une première qRT-PCR ciblait l'extrémité 3' des ARNm qui est constamment retrouvée dans les transcrits de *MAPT* (sonde Hs00902194_m1 ciblant l'ensemble des ARNm de *MAPT*). Nous avons aussi mis au point une seconde qRT-PCR ciblant la jonction exon 0 / exon 1 qui n'est présente que dans les ARNm débutant à l'exon 0 (sonde ciblant uniquement les ARNm issus du promoteur A). Dans la mesure où il n'existe pas de séquence spécifique aux ARNm issus du promoteur B, nous avons analysé de manière indirecte l'expression des ARNm issus du promoteur B en réalisant le rapport entre les ARNm totaux de *MAPT* et les ARNm issus du promoteur A. Enfin, nous avons également analysé l'expression des ARNm de *MAPT* comprenant l'exon 10 par qPCR TaqMan® (sonde Hs00902192_m1 ciblant la jonction exon 9 / exon 10). Les expressions des transcrits de *MAPT* a été comparé à l'expression d'un gène contrôle : le gène *UBC* (sonde Hs00824723_m1), un gène de ménage codant l'Ubiquitine C et exprimé de manière ubiquitaire. Toutes les qRT-PCR ont été effectuées sur un ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems™) en triplicate pour chaque échantillon, selon les recommandations du fabricant. La méthode de comparaison des CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) a été utilisée pour calculer les niveaux d'expression relatifs.

Les niveaux d'expression des transcrits de *MAPT* dans chaque groupe de malades ont été comparés aux niveaux d'expression des témoins selon le test non paramétrique de comparaison de rang de Mann-Whitney/Wilcoxon. Nous avons appliqué aux tests de Mann-Whitney/Wilcoxon une correction de Bonferroni pour la réalisation de tests multiples (deux groupes de malades testés : MA et PSP). Les tests statistiques de Mann-Whitney/Wilcoxon ont été effectués au niveau bilatéral, avec un risque α de 0,025 après correction de Bonferroni. Dans un second temps, nous avons réalisé une ANOVA comparant les patients MA selon leur stade de Braak (Braak 3-4 ou 5-6). La corrélation entre les mesures d'expression des transcrits de *MAPT* a été testée sur l'ensemble des échantillons lors d'une corrélation de Pearson avec un risque α de 0,0167 après correction de Bonferroni.

Confirmation de l'altération des différents promoteurs de *MAPT* dans le tissu cérébral

Ces analyses de qRT-PCR nous ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression de l'ensemble des ARNm de *MAPT* (sonde Hs00902194_m1) chez les patients PSP dans les échantillons de région frontale ($p = 0,0039$), mais pas dans la région occipitale ($p = 0,42$). Les taux d'expression de l'ensemble des ARNm de *MAPT* chez les patients MA était augmenté de manière non significative dans la région frontale ($p = 0,69$) et présentait une tendance à l'augmentation dans la région occipitale, non significative après correction de Bonferroni ($p = 0,03 > 0,25$).

Cette augmentation de l'ensemble des ARNm de *MAPT* chez les PSP ne s'accompagne cependant pas d'une augmentation de l'expression des ARNm issus du promoteur A ($p = 0,56$ et $0,37$; respectivement dans les régions frontales et occipitales). Chez les patients MA, nous notons même une diminution de l'expression des ARNm issu du promoteur A ($p = 2,2 \times 10^{-4}$ et $0,0027$; respectivement dans les régions frontales et occipitales).

Pour estimer l'expression des transcrits issus du promoteur B, seule une approche indirecte est possible puisque les séquences codantes des transcrits sont identiques à partir de l'exon 1. Nous avons donc utilisé le rapport entre les ARNm issus du promoteur A et l'ensemble des ARNm de *MAPT*. Nous observons ainsi une diminution de ce rapport dans tous les groupes de malades testés : chez les patients MA, dans les régions frontales et occipitales ($p = 1,1 \times 10^{-4}$ et $9,2 \times 10^{-5}$ respectivement) et chez les patients PSP, dans la région frontale uniquement ($p = 0,02$). L'ensemble de ces résultats est résumé dans la figure 37.

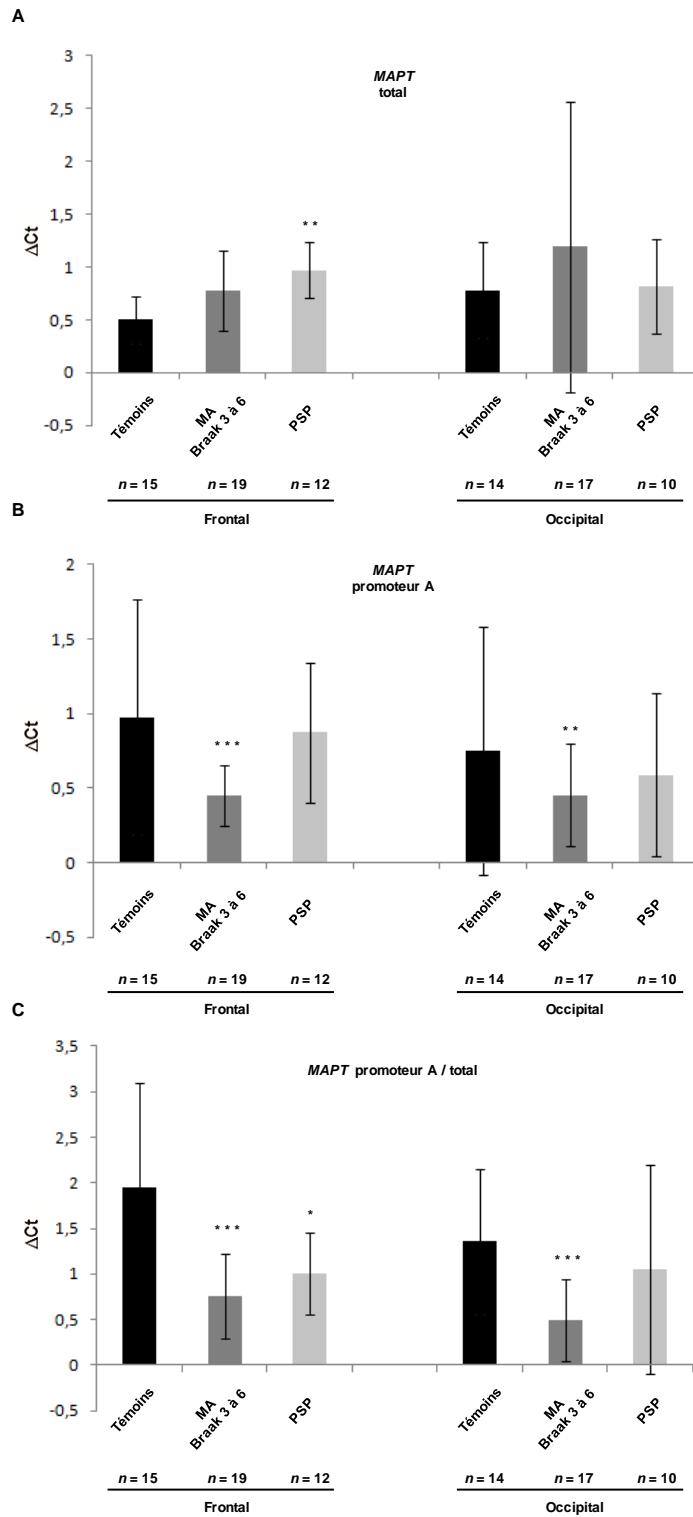


Figure 37 : Mesure de l'expression des ARNm de *MAPT* par qRT-PCR.

Représentation sous forme d'histogramme des résultats de qPCR. Les résultats sont représentés par la médiane +/- intervalle interquartile. **A.** Expression de l'ensemble des transcrits de *MAPT*. **B.** Expression des transcrits de *MAPT* issus du promoteur A. **C.** Estimation de l'activité du promoteur B par le rapport (promoteur A / total).

ANOVA patients Alzheimer

Lorsque nous comparons les niveaux d'expression des ARNm de *MAPT* dans le cerveau des patients MA selon leur stade de Braak, nous observons une différence significative entre ces deux sous-groupes de patients Braak 3-4 et Braak 5-6. En effet, les patients MA Braak 3-4, qui n'ont pas de pathologie tau dans la région occipitale, présentent des rapports ARNm promoteur A/ARNm totaux très différents des Braak 5-6 ($p = 7,6 \times 10^{-4}$). En effet, le niveau d'expression des ARNm des patients MA Braak 3-4 est similaire à celui observé chez les témoins, mais nécessitera des analyses complémentaires sur un nombre d'échantillons plus élevé pour confirmer ces résultats préliminaires.

Altération de l'épissage alternatif selon les promoteurs alternatifs

Nous n'avons pas observé de changements significatifs dans l'expression des ARNm de *MAPT* contenant l'exon 10 (sonde Hs00902192_m1) dans les différents groupes. Mais nous avons été particulièrement surpris de constater que les niveaux d'expression des ARNm issus du promoteur A et ceux des ARNm contenant l'exon 10 était très similaires. Nous avons donc cherché à corréliser les niveaux d'expression obtenus par qRT-PCR pour l'ensemble des échantillons analysés par qRT-PCR ($n = 92$) afin d'étudier s'il n'existait pas un épissage différent de l'exon 10, selon le promoteur utilisé.

Nous observons une corrélation entre l'expression de l'ensemble des ARNm de *MAPT* et les ARNm de *MAPT* contenant l'exon 10 ($r = 0,28$; $p = 0,007$) (Figure 38.A). Cette corrélation modeste peut s'expliquer par l'absence de corrélation après correction de Bonferroni entre l'activité du promoteur B (rapport d'expression) et les ARNm contenant l'exon 10 ($p = 0,027$) (Figure 38.B). A l'inverse, nous mettons en évidence une très forte corrélation entre l'activité du promoteur A et les ARNm contenant l'exon 10 ($r = 0,61$; $p = 1,1 \times 10^{-10}$) (Figure 38.C). Au total, les ARNm issus des différents promoteurs n'incluent donc pas l'exon 10 avec la même efficacité. Cette inclusion de l'exon 10 dans les transcrits de *MAPT* est selon cette analyse préliminaire surtout observée dans les transcrits issus du promoteur A.

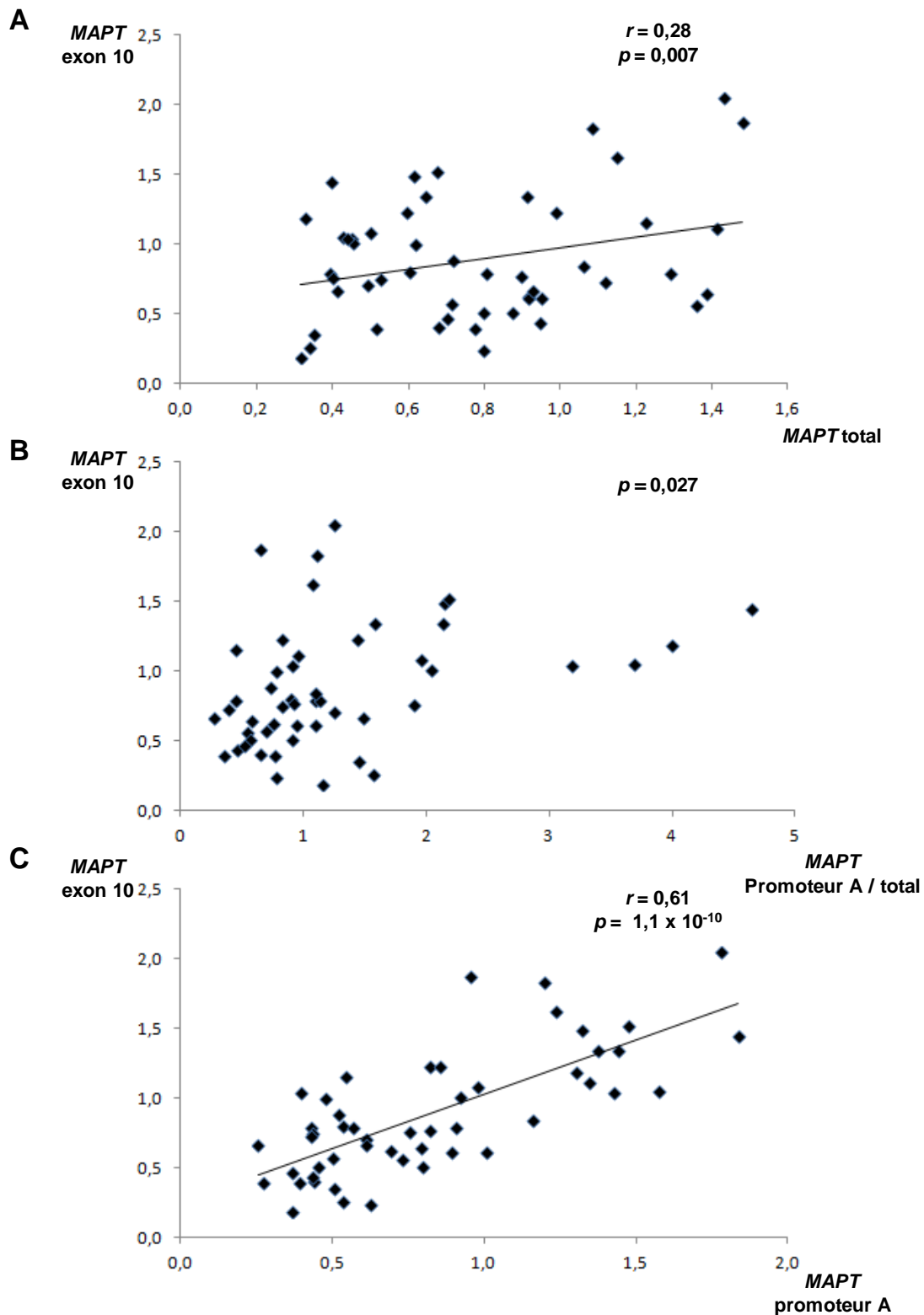


Figure 38 : Corrélation entre l'expression des ARNm de *MAPT* issus des différents promoteurs et les ARNm de *MAPT* avec exon 10.

A. Corrélation entre l'ensemble des ARNm de *MAPT* et les ARNm de *MAPT* contenant l'exon 10, région frontale. **B.** Corrélation entre les ARNm de *MAPT* issus du promoteur A et les ARNm de *MAPT* contenant l'exon 10, région frontale. **C.** Corrélation entre le rapport (promoteur A / total) et les ARNm de *MAPT* contenant l'exon 10, région frontale.

Mise en évidence des transcrits alternatifs dans le cerveau humain par 5'RACE

Matériels et méthodes

Afin de confirmer l'existence dans le tissu cérébral humain de transcrits alternatifs du gène *MAPT* issus du promoteur B, nous avons réalisé une 5'RACE-PCR suivie d'un clonage In-Fusion® dans un plasmide pRACE linéarisé. L'ensemble des 5'RACE-PCR a été réalisé sur les échantillons présentant un RIN > 7, conformément aux recommandations du fabricant. Afin d'éviter une sélection d'isoformes de *MAPT* qui ne seraient présentes que chez un type de malades ou chez certains individus, nous avons étudiés trois pools d'ARNm extraits d'échantillons cérébraux : un pool de témoins correspondant au mélange équimolaire des ARNm de 15 témoins, un pool de MA (11 échantillons mélangés) et un pool de PSP (12 échantillons mélangés). Brièvement, l'amplification rapide des ARNm entiers en ADNc comprenant l'ensemble des extrémités 5' a été réalisée à l'aide du kit SMARTer® RACE 5'/3' (Clontech, Mountain View, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. Pour la synthèse d'ADN, 1 µg d'ARN total a été converti en ADN puis utilisé pour la 5'RACE-PCR. Un mélange réactionnel de PCR de 50 µl a ensuite été préparé. Il était composé de 2,5 µl d'ADN, 5 µl de 10X Universal Primer Mix (UPM), 1 µl d'amorce spécifique du gène d'intérêt (GSP1) concentrée (10 µM) et 41.5 µl de Master Mix (Clontech). L'amorce spécifique de *MAPT* (GSP1 : GATTACGCCAAGCTTCTGGCCACCTCCTGGTTTATGATGGAT) conçue pour la 5'RACE-PCR est complémentaire d'une séquence spécifique de l'ensemble des ARNm codants de *MAPT* localisée au niveau de la jonction entre les exons 11 et 12.

L'ARNm de *MAPT* le plus court et codant pour l'isoforme 0N3R devrait avoir une taille d'environ 1130 nucléotides s'il inclut l'exon 0 entier. Les ARNm issus du promoteur B qui n'incluraient pas l'exon 0 devraient donc avoir une taille inférieure à 1130 nucléotides. Nous avons donc fait migrer les ADN obtenus lors de la réaction de 5'RACE-PCR sur un gel d'agarose à 2 % pendant 18 h à 50 mV. Puis, nous avons découpé et extrait du gel les bandes visualisées par l'exposition aux rayons UV qui correspondaient à des tailles inférieures à 1130 nucléotides. Les ADN obtenus ont ensuite été clonés dans le vecteur de clonage pRACE linéarisé (Invitrogen, CA, USA). Les plasmides obtenus ont été extraits en utilisant le kit kit NucleoSpin® Plasmid No Lid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) puis séquencés par l'entreprise GATC Biotech (Zurich, Suisse).

Nous avons enfin cherché à déterminer à quelles protéines tau pouvaient correspondre les potentiels nouveaux ARN obtenus par 5'RACE. Nous avons réalisé une analyse bioinformatique à la recherche de séquence d'initiation de la traduction (ou séquence de Kozak) dans les ARNm que nous avons cloné. En accord avec la littérature, nous avons considéré la séquence consensus suivante pour la ou les séquences de Kozak :

"ccRcc**AUGG**" (où **AUG** correspond au codon start, R représente une purine et les majuscules représentent les nucléotides les plus fréquemment retrouvés) (Kozak *et al.*, 2002). Nous avons ensuite confronté ces résultats aux données de la littérature.

Résultats de 5'RACE

Résultat des clonages

Au total, nous avons séquencé 72 plasmides et 61 contenaient un ADNc de *MAPT*. Parmi les 61 ADNc de *MAPT* que nous avons cloné, 31 clones débutaient à l'exon 0, 2 clones au niveau de l'intron 0, 12 clones à l'exon 1, 5 clones à l'exon 2, 1 clone à l'exon 4 et 10 clones au niveau de l'exon 9. Par la suite, nous nommerons transcrits "α", "β" et "ε" les ARNm débutant respectivement à l'exon 0, à l'exon 1 et aux autres exons.

Concernant les transcrits α, nous avons séquencé plusieurs ADNc de petites tailles débutant par l'exon 0, mais qui ne comportaient qu'une partie de l'extrémité 3' de l'exon 0 (entre 6 et 205 nucléotides sur les 305 de l'exon 0). Ces ADNc débutant à différentes régions de l'exon 0 sont en accord avec les résultats des bases de données Ensembl qui décrit plusieurs transcrits du gène *MAPT* débutant à différents sites de l'exon 0. Nous avons également obtenu un clone dont l'extrémité 5' correspondait à une portion de l'intron 0 très proche de l'exon 0. Ce clone incluait la séquence de l'intron 0 située entre g.43.972.191 et g.43.972.269 sur le chromosome 17 selon le build GRCh37/hg19 du génome humain, soit 139 à 217 pb après l'exon 0. Ces 31 transcrits α et le premier transcrit débutant à l'intron 0 sont susceptibles d'être issus de l'activation du promoteur constitutif "A" en amont de l'exon 0 (Figure 39).

De manière intéressante, nous avons aussi identifié par 5'RACE 12 clones indépendants d'ADNc de petite taille débutant dans l'exon 1 du gène *MAPT*. Ces 12 clones de transcrits β ont été mis en évidence dans les trois pools testés (2 clones dans le pool de témoins, 3 clones dans le pool de MA et 7 clones dans le pool de PSP). Nous avons également obtenu un second clone d'ADNc de *MAPT* dont l'extrémité 5' correspondait à une portion de l'intron 0 comprise entre g.44.038.971 et g.44.039.124 sur le chromosome 17, soit 563 à 716 pb avant l'exon 1. Ces 12 transcrits β et le second transcrit débutant à l'intron 0 sont susceptibles d'être issus de l'activation d'un promoteur alternatif "B" en amont de l'exon 1 (Figure 39).

Les clones débutant aux exons 2, 4 et 9 (transcrits ε) ne sont pas décrits dans les bases de données et pourraient correspondre à des ARNm codant des protéines tau tronquées en N-terminal ou à des ARN non codants.

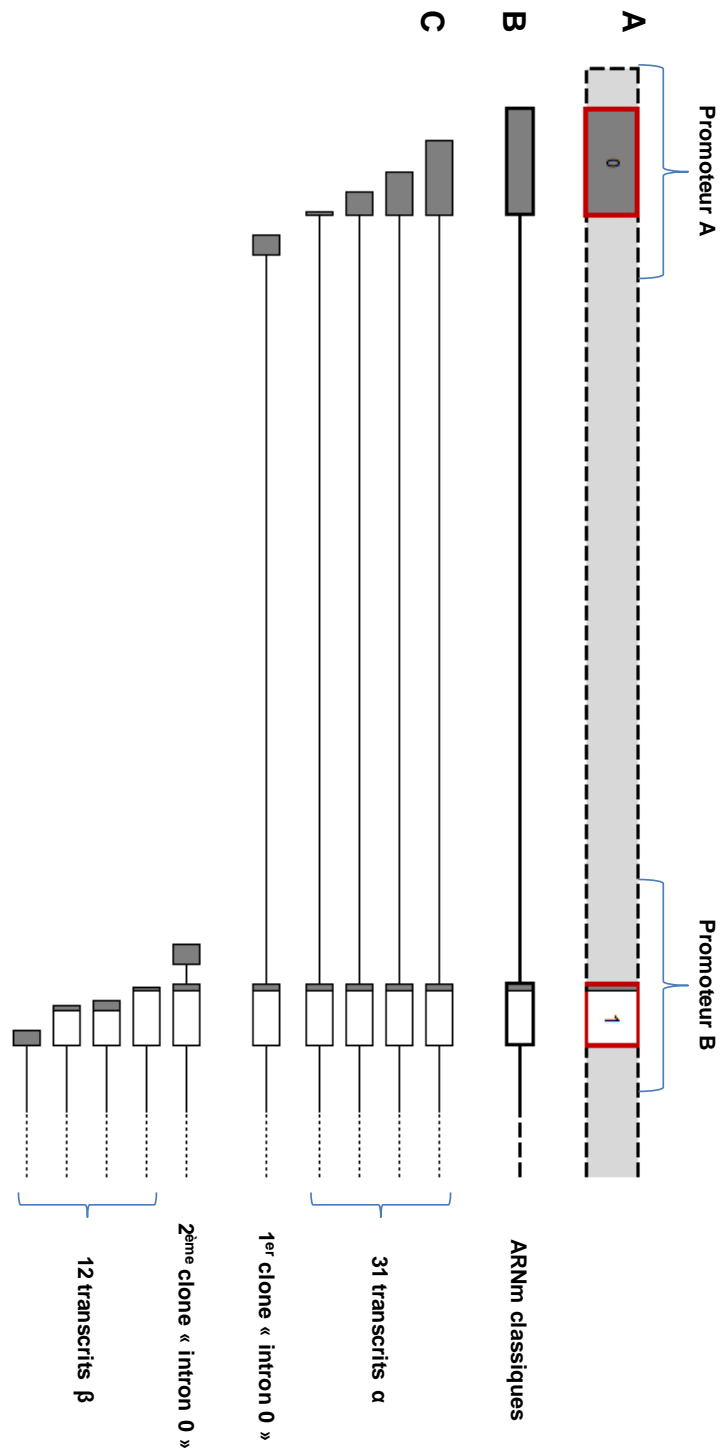


Figure 39 : Analyse par 5'RACE-PCR des ARNm de *MAPT* dans le cerveau humain.

A. Représentation schématique du début du gène *MAPT* avec les promoteurs A et B. Les rectangles rouges représentent les exons 0 et 1. Les régions 5'UTR sont colorées en gris et les régions codantes des exons sont colorées en blanc. **B.** Représentation schématiques des ARNm de *MAPT* classiquement décrits. Les rectangles représentent les exons et les introns inclus dans les ARNm. Les introns représentés par les lignes horizontales ne sont pas inclus. **C.** Représentation schématiques des ARNm cérébraux de *MAPT* mis en évidence par 5'RACE.

Analyse bioinformatique des ARNm

Lorsque nous examinons en détail la séquence des 12 transcrits β , nous observons tout d'abord qu'aucun ADNc ne possède la séquence complète de l'exon 1 qui comprend classiquement 150 pb. Seule une partie de l'extrémité 3' de l'exon 1 est incluse dans ces ADNc (entre 26 et 142 pb). Parmi les 12 clones, 7 incluaient l'exon alternatif 2, un seul incluait l'exon 3, aucun n'incluait l'exon 6 et 5 incluaient l'exon 10.

L'analyse bioinformatique de la séquence des ARNm de *MAPT* retrouve 13 codons AUG et parmi ces 13 possibles codons start, 3 étaient inclus dans une séquence respectant la séquence consensus de Kozak. Les 3 codons start retenus sont localisés :

- au niveau des 18-21^{èmes} pb de l'exon 1 et correspond au site d'initiation de la traduction classique des protéines tau.
- au niveau des 48-50^{èmes} pb de l'exon 1.
- au niveau des 6-8^{èmes} pb de l'exon 5.

En prenant comme référence l'isoforme de protéine tau "2N4R" qui comprend 441 acides aminés; ces trois codons start correspondent respectivement aux méthionines 1, 11 et 127. De manière intéressante, des chercheurs de l'équipe ont identifié dans le cerveau humain des fragments de protéines tau débutant au niveau l'extrémité N-terminale par les méthionines 11 ou 127 (Derisbourg *et al.*, 2015). Ces fragments de protéines tau ont été interprétés comme des produits de modifications post-traductionnelles à type de troncation des protéines tau normales. Cependant, nos résultats de 5'RACE nous conduisent à considérer que ces protéines seraient plutôt issues de la traduction d'ARNm dépendant d'un promoteur alternatif du gène *MAPT*.

Analyse des protéines putatives

Les 12 transcrits β décrits par cette étude respectent le cadre de lecture et peuvent donc potentiellement être traduits en protéines. Les séquences protéiques putatives des ADNc issus du promoteur B sont résumées dans la figure 40.

- Deux ARNm identifiés dans les pools de PSP et de MA, comportent les 140 et 142 dernières pb de l'exon 0. Ces deux ARNm conservent donc la première séquence de Kozak et doivent donc coder une isoforme classique de protéique tau débutant à la méthionine 1.

Plus précisément, cette isoforme protéique ne contenant aucun exon alternatif de *MAPT* serait l'isoforme "0N3R" de 352 acides aminés.

- Deux ARNm comportant les 127 dernières pb de l'exon 0. Ils ne peuvent donc pas être traduits en des protéines tau classiques, mais peuvent potentiellement donner des isoformes protéiques débutant à la méthionine 11. Ces deux ARNm ont été identifiés dans le pool de PSP et n'incluent pas les exons alternatifs 3, 6 et 10. De plus, ces deux ARNm n'incluent pas l'exon 4 qui n'avait pourtant jamais été décrit comme un exon alternatif. L'isoforme protéique putative devrait donc comporter 350 acides aminés et avoir un domaine N-terminal assez différents des autres isoformes de protéines tau de 85 acides aminés.

- Les 8 derniers ARNm ont été retrouvés dans les 3 pools et débutent au niveau des 59 à 26^{èmes} dernières pb de l'exon 0. Ils ne peuvent potentiellement donner que des isoformes protéiques débutant à la méthionine 127 et donc posséder un domaine protéique N-terminal de seulement 17 acides aminés. Ces ARNm incluent pour 5 d'entre eux l'exon 10 et peuvent théoriquement être traduits en protéines de 285 et 316 acides aminés selon l'inclusion de l'exon 10.

Parmi les 16 transcrits ϵ , 15 respectent le cadre de lecture et peuvent donc potentiellement être traduits en protéines. Cependant, l'absence d'exon 1 permet seulement d'envisager la synthèse d'isoformes protéiques débutant à la méthionine 127 qui est située dans le 5^{ème} exon de *MAPT*.

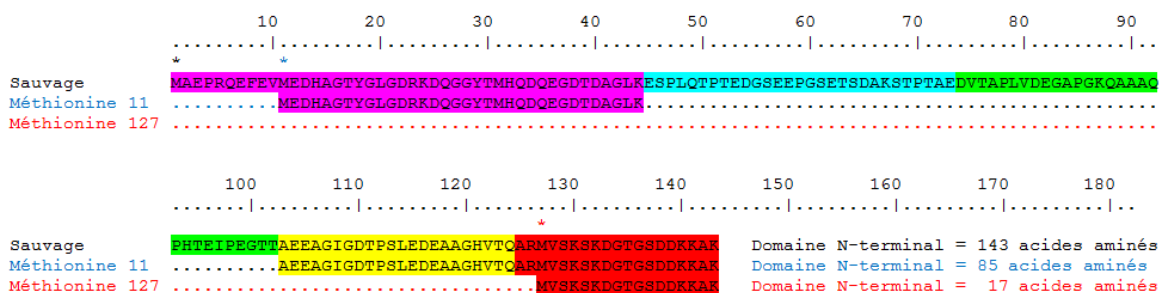


Figure 40 : Les séquences d'acides aminés des protéines tau sauvages et courtes.

Les séquences des extrémités N-terminales (codées par les exons 1 à 5) des protéines tau sauvages classiquement décrites et des nouveaux variants protéiques prédits. La séquence protéique codée par les exons 1 à 5 sont surlignées respectivement en rose, bleu, vert, jaune et rouge. Les astérisques indiquent les sites d'initiation de la traduction putatifs.

Discussion

Constitution de la base d'échantillons

Grace à l'aide des centres parisiens et genevois, nous avons obtenu des tissus cérébraux supplémentaires de témoins sains âgés et de patients. Cela nous a permis d'étudier plus en détail les relations entre l'âge et la méthylation pour nos régions d'intérêt. Ce paramètre est d'autant plus important que nous étudions des pathologies concernant en général le sujet âgé. Cela nous a surtout permis de répliquer nos résultats sur une cohorte indépendante. Au total, notre base d'échantillons comporte désormais 80 patients et 30 témoins (annexe 1). Cette base comprend par ailleurs un nombre important de PSP ($n = 29$). Or, la plupart des études de la littérature incluent de faibles nombres d'échantillons cérébraux de patients souffrant de PSP. A notre connaissance, seules trois grandes études multicentriques ont rapporté des cohortes d'échantillons cérébraux de PSP plus importantes avec respectivement 275 (Allen *et al.*, 2016), 103 (Respondek *et al.*, 2014) et 95 patients (Yoshida, 2014). Notre base de prélèvements cérébraux est donc l'une des plus importantes de France en ce qui concerne la PSP. La constitution de cette base de prélèvements nous aura également permis de développer des collaborations scientifiques dans la recherche sur les tauopathies, de participer à la description d'un cluster de PSP dans le nord de la France et nous espérons que d'autres collaborations suivront.

Le nombre restreint d'échantillons collectés constitue néanmoins comme la principale limite de notre travail. En effet, les échantillons de tissus cérébraux humains sont difficiles à obtenir et certaines des maladies que nous avons étudiées comme la PSP, la DCB et la maladie de Pick sont des maladies rares. Nous n'avons donc pu obtenir un nombre suffisant d'échantillons pour réaliser des tests statistiques fiables dans le cas de la maladie de Pick ($n = 6$), nous amenant à exclure les données relatives à ces patients de nos résultats. L'étude simultanée de plusieurs maladies avait l'inconvénient de nécessiter une puissance statistique plus importante. Il apparaît donc *a posteriori* que notre étude de la méthylation de l'ADN, bien que très ciblée et n'étudiant que quelques nucléotides du gène *MAPT*, était quelque peu surévaluée au regard de la rareté des maladies étudiées et du nombre de nécropsies accessibles dans la neurobanque.

Cluster de PSP dans le Nord de la France

Nous avons eu la chance lors de cette thèse d'université de pouvoir étudier un cluster de PSP dans la région de Wattrelos (Nord) qui pourrait être lié à une contamination industrielle par les métaux lourds (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2015). Comme pour la PSP sporadique, les patients du cluster de PSP que nous avons rapportés possèdent plus fréquemment l'haplotype H1 et le sous-haplotype H1c du locus de *MAPT*. Cependant, cette

étude n'a été réalisée que sur un très faible nombre de patients ($n = 12$) et ne permet pas de réaliser de tests statistiques fiables. Néanmoins, ces fréquences d'haplotypes similaire à la PSP sporadique, l'isolement géographique moindre et le fait que différentes ethnies ont présenté la maladie nous laisse penser que dans le cas de ce cluster de PSP, la génétique a bien moins d'impact sur la survenue de la maladie que les facteurs environnementaux. La localisation géographique très limitée et l'existence d'une contamination industrielle en métaux lourds témoignent du rôle encore mal étudié de l'environnement dans les tauopathies.

La description du cluster de PSP dans la région de Wattlelos rappelle beaucoup les précédentes descriptions d'épidémies de tauopathies dans certaines régions du globe comme dans les cas du syndrome de l'île de Guam (Elizan *et al.*, 1966) et du parkinsonisme de la Guadeloupe (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002). Les causes de ces maladies demeurent aujourd'hui encore hypothétiques et pointent essentiellement des facteurs de prédisposition génétique et/ou des facteurs environnementaux. En effet, les populations concernées étaient isolées géographiquement (îles de Guam et de Guadeloupe) et partageaient donc des environnements similaires. De plus, l'isolement géographique est aussi responsable d'un isolement génétique qui peut favoriser certains traits ou maladies génétiques. Dans le cas du parkinsonisme de la Guadeloupe, le rôle de neurotoxines issues de la consommation de plantes tropicales de la famille des *Annonaceae*, notamment *Annona muricata* (le corosol), a été évoqué (Lannuzel *et al.*, 2007). Ces plantes possèdent des taux élevés d'acétogénines qui sont des composés capables d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Plusieurs études ont porté sur un éventuel dysfonctionnement des mitochondries dans le cerveau de patients atteints de PSP (Lannuzel *et al.*, 2003; Champy *et al.*, 2005). Dans le cas du syndrome de Guam, seule la population autochtone était concernée par cette maladie ce qui pouvait faire évoquer des facteurs de risque génétique propres à cette population. Mais différentes toxines issues de l'environnement ont également été évoquées et notamment un acide aminé neurotoxique, la β -N-Méthylamino-L-alanine, produit par des cyanobactéries et s'accumulant dans l'alimentation des habitants de l'île (Banack *et al.*, 2006). Toutefois, les études portant sur la toxicité de cette molécule ont donné des résultats contradictoires. En 2011, Lee et collaborateurs n'ont pas retrouvé lors d'une étude *in vitro*, de toxicité suffisamment importante de la β -N-Méthylamino-L-alanine aux doses ingérées par les malades (Lee & McGeer, 2012). A l'inverse, une récente étude *in vivo* réalisée sur des singes présentant un génotype *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ a permis d'observer des lésions histologiques similaires à celles observées chez les humains (Cox *et al.*, 2016). Cette dernière étude indique que l'exposition chronique à cette toxine environnementale peut déclencher une neurodégénérescence chez des individus vulnérables. Au total, ces études

illustrent la difficulté d'étudier les effets de l'environnement dans le développement des maladies neurodégénératives. En effet, il serait probablement plus judicieux d'étudier des intoxications chroniques, à faibles doses et agissant sur des patients présentant un terrain de prédisposition génétique (pour revue : (Migliore & Coppedè, 2009)).

Plusieurs polluants et plusieurs mécanismes physiopathologiques pourraient expliquer cette fréquence anormale de PSP dans la région de Watrelos. L'un des principaux suspect est l'arsenic, qui a été retrouvé en grande quantité dans les sols de Watrelos. En effet, la pathogénicité de l'arsenic en cas d'intoxication aiguë ou chronique n'est plus à démontrer et il présenterait notamment une neurotoxicité même à faible taux (pour revue : (Tsuji *et al.*, 2015)). Fait intéressant, l'un des mécanismes de toxicité chronique de l'arsenic pourrait consister en des modifications de l'épigénome. En effet, l'arsenic est méthylé dans l'organisme ce qui diminue la quantité de S-adénosylméthionine (SAM) dans les cellules (Paul & Giri, 2015). D'autres études ont également mis en évidence des perturbations de l'épigénome liées à l'arsenic (Du *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). Il serait intéressant d'évaluer si une exposition à long terme pourrait conduire à une dérégulation de la méthylation de *MAPT*. D'autres études sont en cours afin de déterminer la cause exacte de ce cluster de PSP avec l'espoir de mieux comprendre aussi l'étiologie de la PSP sporadique. Cependant, si une cause environnementale devait être prouvée, elle pourrait se révéler importante pour la recherche concernant d'autres tauopathies, mais aussi en termes de politique de prévention.

Nous pouvons nous demander avec la description de ce cluster, si notre base de prélèvements n'était pas biaisée pour les PSP du fait de patients ayant probablement été exposés à certains toxiques de l'environnement. En effet, nous avons étudié 11 échantillons cérébraux de PSP sur les 18 décrits dans l'étude du cluster de Watrelos (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2015). C'est pourquoi, l'étude d'autres témoins et PSP des neurobanques de Paris et Genève est importante car elle a non seulement permis de répliquer l'étude de méthylation de l'ADN, mais aussi elle a permis d'obtenir la puissance statistique suffisante pour démontrer que l'origine des patients PSP ne consistait pas un biais de sélection. Afin d'infirmer ce biais dans le cas de l'étude de la méthylation de l'ADN, nous avons comparé les niveaux de méthylation de l'ADN entre les PSP du cluster Watrelos ($n = 11$) et les autres PSP ($n = 18$) et n'avons pas trouvé de différence significative. Le taux moyen de méthylation de CpG1 dans les échantillons frontaux était même encore plus diminué chez les PSP de Paris et Genève ($33,7 \% \pm 5,1$) par rapport aux PSP du cluster ($36,3 \% \pm 2,9$) ($p = 0,15$). Bien que les effectifs entre ces deux sous-groupes de PSP restent trop faibles pour détecter de petites différences, et réaliser un ajustement sur l'âge et l'haplotype H1/H2, ces différences sont trop faibles pour que nos résultats de méthylation de CpG1 soit liée au

nombre de PSP issus du cluster de Wattlelos. De plus, lors de l'analyse de réplication pour laquelle nous avons analysé 11 cas PSP ne provenant pas du cluster de Wattlelos et 12 témoins, nous retrouvons une différence de méthylation similaire. En effet, lors de la première analyse, la différence de méthylation de CpG1 entre les groupes PSP et les témoins était -4,0 % (IC à 95%, -6,4 à -1,7) par rapport à -5,4 % (IC à 95%, -10,1 à -0,6) dans l'analyse de réplication.

Hypométhylation du gène *MAPT* dans la PSP

Analyses de méthylation

Lors de notre étude de la méthylation du gène *MAPT*, nous avons adopté une approche ciblée des régions à tester. Cette approche se justifiait par le faible nombre d'échantillons disponibles et par la sensibilité des méthodes utilisées. Un autre point intéressant de cette approche est qu'elle nous a permis d'étudier d'autres régions du gène qui ne sont pas la cible privilégiée des EWAS. En effet, la plupart des études de la méthylation de l'ADN réalisées de nos jours reposent sur les technologies de microarray après traitement au bisulfite (principalement le système Illumina 450k Infinium) et sur les techniques de NGS (pour revue : (Laird, 2010)). Ces techniques de "haut-débit" couramment utilisées pour la recherche ont une résolution de l'ordre du nucléotide et permettent d'avoir une idée générale de l'ensemble des cytosines méthylées du génome entier (ou méthylome) d'un tissu (pour revue : (Sun *et al.*, 2015)). Cependant l'analyse simultanée de nombreux CpG (entre 2,5 et 28 millions de CpG par échantillons selon les méthodes) nécessite un traitement bioinformatique et des corrections statistiques (Buhule *et al.*, 2014). Par exemple, dans le cas d'une analyse sur puce Illumina 450K qui permet d'analyser simultanément près de 485 000 sites CpG, la *p-value* après correction de Bonferroni est inférieure à $1,03 \times 10^{-7}$. Si nous avions dû appliquer un risque α similaire pour notre analyse de la méthylation de l'ADN, avec des différences de méthylation et une variance similaire, nous n'aurions pu obtenir un résultat significatif qu'en disposant d'un nombre d'échantillons deux fois plus élevé dans chacun des groupes étudiés. Ce type d'approche à haut-débit est donc très difficile à utiliser dans le cas des maladies neurodégénératives humaines à moins d'étudier un plus grand nombre d'échantillons.

Il convient aussi de prendre en compte les difficultés inhérentes à l'étude directe du tissu cérébral dans les maladies neurodégénératives. En effet, contrairement à l'étude des cellules en culture ou de la plupart des tissus périphériques, le tissu cérébral est très hétérogène contenant de nombreux types cellulaires. Or chaque type cellulaire présente des modifications épigénomiques qui lui est propre ce qui peut atténuer les différences mesurées

si elles ne concernent qu'un nombre restreint de types cellulaires. C'est notamment le cas pour les tauopathies où seulement une faible proportion de neurones ou de cellules gliales sont concernées par la pathologie tau. De plus, les cellules en dégénérescence sont remplacées par d'autres types cellulaires ou s'accompagnent de réactions inflammatoires qui elles-mêmes peuvent être responsables de modifications épigénomiques.

Enfin, le cerveau ne doit pas être considéré comme un tissu homogène mais plutôt comme une multitude de tissus ayant chacun sa fonction et sa composition particulière en types cellulaires. L'étude des modifications épigénomiques du tissu cérébral est donc d'autant plus difficile qu'il s'agit d'étudier toujours la même région voir d'utiliser des techniques de microdissection, ce qui ajoute encore de la variabilité. Dans le cas de notre étude, nous avons en effet constaté de petites différences de méthylation de l'ADN selon l'origine des échantillons (2,8 à 3,25 % de différence pour CpG1 entre les mêmes groupes de malades ou de témoins de la neurobanque de Lille et de Paris). Ces différences sont surtout liées à l'âge et à l'haplotype H1/H2 et ont été prises en compte lors de l'ajustement. Mais elles sont probablement aussi liées au fait que les régions cérébrales étaient disséquées par des personnes différentes. Néanmoins, l'étude de réplication réalisée sur les échantillons parisiens retrouvait des différences de méthylation similaires entre témoins et PSP.

Interprétation de l'hypométhylation de CpG1 ?

Les limites

Le nombre restreint d'échantillons que nous avons étudiés constitue la limite majeure de cette étude et s'explique par notre choix d'étudier directement le tissu cérébral humain. Il en résulte que nous ne pouvons pas raisonnablement exclure la possibilité que nos résultats soient faussement positifs, en raison du faible nombre d'échantillons étudiés. Ces résultats sur la CpG1 ont toutefois pu être répliqués sur une seconde cohorte.

Un autre désavantage lié à la conception de l'étude concerne le ciblage à quelques pyroséquences du gène *MAPT*. En effet, nous n'avons couvert que 15 CpGs (dont les 5 de l'intron 0) sur les 2441 sites CpG que compte le gène *MAPT* et nous devons donc admettre que nous avons eu beaucoup de chance dans notre recherche de sites CpG anormalement méthylés dans les tauopathies. Toutefois, d'autres régions du gène mériteraient d'être explorées, comme celle située en amont de l'exon 1.

La méthylation de l'ADN du gène *MAPT* a déjà été associée avec la MA dans une étude assez proche de la nôtre (Iwata *et al.*, 2014). Les auteurs ont montré que la

méthylation de l'ADN, mesurée par pyroséquençage et ciblant trois gènes impliqués dans la MA (*MAPT*, *APP* et *GSK3B*), est altérée dans le tissu cérébral humain de patients souffrant de MA. Concernant le gène *MAPT*, les auteurs ont étudié la région de l'exon 0 et son grand îlot CpG, en rapport avec ce que nous appelons le promoteur A (Figure 28 (Article 2, Figure 1)). Les variations épigénétiques concernent 4 CpGs consécutives dans l'exon 0 de *MAPT* avec des taux de méthylation de 1 à 2 % plus faibles chez les malades par rapport aux témoins *MAPT*; ce qui aurait pour conséquence d'augmenter l'expression des ARNm de *MAPT* et de favoriser la neurodégénérescence. Il est donc possible que d'autres tauopathies présentent une signature épigénétique spécifique, mais qui concernent des régions différentes et pas encore étudiées.

Nous avons aussi initialement l'intention de conforter les résultats de la méthylation de l'ADN par l'analyse d'autres marques épigénétiques, notamment les modifications post-traductionnelles des histones par Chromatin immunoprecipitation (Chip). Cependant, la caractérisation et la limitation de la région génique impliquée dans la pathologie ne nous a pas laissé le temps de réaliser ces expériences.

Les points forts

L'utilisation du tissu cérébral humain est le principal point fort de cette étude. En effet, le choix du tissu cérébral se justifiait pleinement car il permettait d'apporter un niveau de preuve supérieur en étudiant directement le tissu pathologique. De plus, l'étude du tissu cérébral limite les biais dans les taux de méthylation qu'il est possible d'observer entre les tissus. Ces différences entre les tissus est d'ailleurs visible entre les différentes aires cérébrales avec des taux de méthylation chez les mêmes individus témoins qui peuvent différer de 6,93 % en moyenne entre les deux aires A10 et A18 pour la CpG1.

Une autre preuve de l'avantage des études épigénétiques sur tissus pathologiques par rapport aux études réalisées sur le sang ou les cellules en culture, est apportée par l'étude de Walton et collaborateurs qui ont corrélé les niveaux de méthylation entre le tissu cérébral et le sang afin de rechercher une signature épigénétique de la schizophrénie (Walton *et al.*, 2016). Les auteurs ont observé une corrélation importante dans seulement 7,9 % des sites CpG. Toujours selon cette étude, la plupart des marqueurs de méthylation de l'ADN décrits dans le cerveau pour la schizophrénie ne peuvent pas être prédits de façon fiable par l'état de méthylation de l'ADN extrait du sang périphérique. Cette étude montre donc que sang n'est pas le tissu de choix en première intention pour la recherche de biomarqueurs des maladies psychiatriques et c'est probablement aussi le cas pour les maladies neurodégénératives. Cela justifie donc d'étudier un tissu pathologique dans le

cadre d'études exploratoires comme la nôtre. Par contre, toujours selon cette étude, une analyse restreinte à certains marqueurs dans le sang pourrait permettre d'obtenir une approximation de la méthylation de l'ADN dans le cerveau et servir de biomarqueurs pour le diagnostic de schizophrénie, voire d'autres affections cérébrales.

Nous avons également réussi à prendre en compte ou à éliminer de nombreux facteurs confondants, ce qui n'est pas toujours effectué dans les études épigénétiques similaires à la nôtre. Par exemple, Iwata et collaborateurs ont comparé des groupes de témoins et de MA appariés selon l'âge et n'avaient pas retrouvé d'influence du sexe ou du PMI sur la méthylation de l'ADN (Iwata *et al.*, 2014). Mais les auteurs n'ont pas pris en compte l'haplotype H1/H2 ce qui pourrait potentiellement constituer un facteur confondant pour la méthylation de *MAPT* en raison d'une possible association entre l'haplotype H1/H2 et la MA (Pastor *et al.*, 2015). L'étude de Coupland et collaborateurs, quant à elle s'est concentrée sur une petite portion de la région de l'exon 0 (incluse dans le promoteur A) (Figure 28) analysée par pyroséquençage. Les résultats obtenus sont comparables aux nôtres en mettant en évidence un effet de l'haplotype et de l'âge sur la méthylation de *MAPT* (Coupland *et al.*, 2013). Les auteurs ont également noté des variations de méthylation selon le sexe, ce qui n'a pas été observé ni dans notre étude ni dans celle d'Iwata et collaborateurs. Coupland et collaborateurs notent que l'ensemble de ces facteurs aboutissent à une hyperméthylation de l'ADN qui est corrélée avec la diminution des ARNm totaux de *MAPT* ce qui aurait pour conséquence de protéger les cellules de la neurodégénérescence. Cependant, ils n'ont pas réussi à observer une association entre la méthylation de l'ADN et la maladie de Parkinson après ajustement avec les covariables âge, sexe et haplotype H1/H2.

Méthylation du gène MAPT dans les tauopathies : cause ou conséquence ?

En extrayant l'ADN du tissu cérébral, nous ne séparons pas les différentes populations de neurones ou les cellules gliales, mais étudions le tissu dans sa globalité. Il n'est donc pas possible avec ces analyses de déterminer si ce sont les cellules nerveuses touchées par la pathologie tau qui sont hypométhylées ou bien si les modifications que nous observons sont le résultat d'une prolifération de cellules gliales qui modifierait la proportion de cellules astrocytaires et changerait alors les taux de méthylation dans l'ensemble du tissu.

Plusieurs arguments vont toutefois à l'encontre de l'hypothèse d'une réaction gliale pour expliquer les modifications épigénétiques. En effet, la pathologie tau touche à la fois les neurones et les cellules gliales dans la PSP. La réaction gliale est observée dans d'autres pathologies comme la DCB et dans une moindre mesure la MA, tandis qu'une perte

neuronale importante est observée dans la maladie de Pick. Cependant nous n'avons pas observé de différence de méthylation dans les échantillons frontaux pour ces pathologies. Enfin, Iwata et collaborateurs ont démontré dans leur étude, grâce à un triage des neurones par marquage fluorescent des cellules couplé à la cytométrie de flux, que les neurones comme les autres cellules cérébrales présentent des modifications épigénétiques de *MAPT* dans le cerveau des patients MA (Iwata *et al.*, 2014). Des expériences complémentaires de triage cellulaire, de microdissection ou de sélection des noyaux des neurones par l'utilisation de tag viraux (Jiang *et al.*, 2008) pourraient permettre de déterminer si ce sont ou non les cellules atteintes par la pathologie tau qui présentent des modifications de leur épigénome.

Nous ignorons également si les modifications épigénétiques de *MAPT* que nous rapportons sont secondaires et préviennent la pathologie tau ou au contraire si l'hypométhylation de l'intron 0 dérégule l'expression de *MAPT* dans ces cellules et mène à la pathologie tau. En effet, nous ne savons pas si ces modifications épigénétiques apparaissent avant ou après les lésions histologiques. Enfin, des études fonctionnelles sont requises pour déterminer si l'hypométhylation de l'intron 0 est responsable d'une dérégulation de *MAPT* et conduit à la pathologie tau. Il serait intéressant de réaliser des études sur plusieurs aires cérébrales atteintes et non atteintes par la pathologie tau chez des patients PSP présentant différents stades de la maladie afin de définir une éventuelle temporalité entre l'apparition des modifications épigénétiques et des lésions histologiques.

Méthylation du gène MAPT et expression des ARNm

Lors de nos études de qPCR, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression des ARNm de *MAPT* et la méthylation de l'ADN dans la région de l'intron 0. Dans leur étude sur tissu cérébral humain, Iwata et collaborateurs n'ont pas étudié les ARNm cérébraux en raison de la dégradation importante des ARN dans ce type de tissu. Ils ont toutefois démontré *in vitro* l'effet fonctionnel de ces modifications épigénétiques sur la transcription de *MAPT* en augmentant la méthylation de différentes CpG cibles dans des cultures cellulaires, ce qui aboutissait à une diminution de l'expression des transcrits de *MAPT* (Iwata *et al.*, 2014). Coupland et collaborateurs n'ont obtenu qu'une modeste corrélation entre la méthylation de l'ADN de *MAPT* et l'expression des ARNm du gène après régression linéaire multiple et en considérant les covariables âge, sexe et haplotype H1/H2 ($r = 0,27$; $p = 0,043$) (Coupland *et al.*, 2013).

Il était peut-être illusoire de vouloir corréler une qPCR, reflet de la quantité d'ARNm d'un tissu à un instant t , et la méthylation de l'ADN, laquelle reflète plutôt une évolution de la régulation épigénomique au niveau tissulaire sur plusieurs mois ou années. Cela s'explique

lorsqu'on considère que les variations épigénomiques modifient l'état de compaction de la chromatine mais ne sont pas responsables, à elles seules, de la transcription active des cellules. L'association entre méthylation de l'ADN et l'inactivation ("silencing") des gènes ne suffit pas pour expliquer la complexité de la régulation génique orchestrée par les modifications épigénomiques. Notre étude sur le promoteur alternatif intragénique de *MAPT* en est un bon exemple. Il est d'ailleurs probable que l'activation du promoteur alternatif de *MAPT* que nous évoquons dans ce travail, aboutisse également à l'inhibition du promoteur constitutif. Si cela devait être le cas, il ne serait alors pas possible de corrélérer comme nous l'avons fait (corrélation de Pearson), l'expression des ARNm totaux de *MAPT* avec la méthylation de l'ADN. Il serait probablement même nécessaire d'envisager plutôt des modèles statistiques plus complexes comme des modèles de régression linéaire multivariée.

Il est possible que le site CpG1, seul site CpG anormalement méthylé mis en évidence, ne soit pas directement responsable d'une modulation de la transcription de *MAPT*. En effet, la méthylation de l'ADN n'est pas un phénomène limité à un unique site CpG, mais plutôt un phénomène localisé et dirigé contre différentes régions géniques ou du génome. Cela s'observe notamment avec l'importante corrélation des taux de méthylation de l'ADN que nous observons entre CpG1 et les CpG34 à 37 dans le petit îlot CpG situé 583 pb en aval. Il nous faut donc plutôt considérer les anomalies de méthylation de CpG1 dans la PSP comme un « mouchard » rapportant la méthylation du rivage CpG de l'intron 0. Il pourrait être intéressant de rechercher d'autres sites CpG associés à la PSP et qui pourrait corrélérer avec l'expression génique, par exemple dans l'îlot CpG ou en amont de la CpG1. De nouvelles études portant sur la méthylation du gène *MAPT* pourraient se révéler utiles pour mettre en évidence d'autres régions géniques altérées dans la PSP et/ou d'autres tauopathies comme la MA. Ces travaux pourraient ainsi concerner des régions plus larges du gène par séquençage NGS après traitement au bisulfite ou encore il serait aussi possible de cibler d'autres régions du gène. Tout particulièrement, nos études réalisées en seconde partie de thèse nous encouragent à nous intéresser à la région de l'exon 1.

Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des ARNm totaux de *MAPT* dans les prélèvements cérébraux frontaux des patients PSP. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par Höglinger et collaborateurs qui ont pu associer les génotypes de différents SNP du locus de l'haplotype H1/H2 qui était surreprésentés chez les PSP, avec l'expression des transcrits de différents gènes du locus, dont *MAPT* dans le cervelet et le cortex frontal humain (Höglinger *et al.*, 2011). Ce résultat a également été observé dans le cas de la DCB (Kouri *et al.*, 2015). Il est donc probable que l'hyperexpression des ARNm de *MAPT* que nous avons observé dans le cerveau des patients PSP expliquée par des modifications épigénétiques provenant de variants *en cis*.

En résumé, nous ne sommes pas capables aujourd'hui de définir si les différences de méthylation de l'ADN sont la cause ou la conséquence de la neurodégénérescence dans la PSP. Il apparaît donc nécessaire de limiter notre interprétation de la méthylation de *MAPT* à une signature épigénétique de la pathologie tau dans la PSP, sans présumer de son rôle dans la survenue de la maladie. Par contre la description de cette signature épigénétique des tauopathies présente l'intérêt d'envisager de nouvelles hypothèses et perspectives de recherche.

Hypothèses et perspectives

Effet de l'haplotype

Nous avons confirmé l'association précédemment décrite entre l'haplotype H1/H2 et des modifications de la méthylation de *MAPT* (Li *et al.*, 2014 ; Coupland *et al.*, 2013). L'haplotype H1/H2 est le principal facteur de risque génétique pour PSP (Baker *et al.*, 1999; Höglinger *et al.*, 2011) et le deuxième facteur de risque génétique de la maladie de Parkinson (Simon-Sanchez *et al.*, 2009). De plus, ce risque génétique serait conféré par des modifications épigénétiques (Li *et al.*, 2014). Cela pourrait s'expliquer par l'existence de variations génétiques *en cis* et en déséquilibre de liaison avec l'inversion de 900 kb, par l'altération de la structure de la chromatine au niveau du locus et/ou par le déplacement d'éléments de régulation à longue distance. Toutefois, nous n'avons pas pu corrélérer l'haplotype H1/H2 de *MAPT* et l'expression des ARNm totaux. Ces résultats sont en accord avec les dernières études sur le sujet (Trabzuni *et al.*, 2012), mais ne nous permettent pas de comprendre comment cet haplotype peut constituer un facteur de risque génétique de développement de certaines maladies neurodégénératives. Il est possible que les différences de méthylation de l'ADN liées à l'haplotype H1 ne soient pas suffisantes à elles seules pour favoriser la survenue des tauopathies, pas plus que pour induire une expression différentielle et/ou d'épissage de *MAPT*. Par contre, il est possible qu'elle s'accompagne d'un état relâché de la chromatine au niveau de ce locus favorisant une transcription plus importante et/ou un épissage sensiblement différent en réponse à un stress ou à un état pathologique.

Effet de l'âge

De manière intéressante, nous avons mis en évidence une diminution de la méthylation de l'ADN du gène *MAPT* avec l'âge. Cette diminution est observable avec le site

CpG1, mais également au niveau de l'îlot CpG de l'intron 0 (CpG34 et 35). La méthylation de l'ADN est bien connue pour évoluer avec le vieillissement dans différents tissus (Horvath, 2013) et notamment le cerveau (Hernandez *et al.*, 2011), ce qui suggère que les changements épigénétiques peuvent constituer un élément important du processus de vieillissement. Les variations de méthylation avec l'âge que nous mettons en évidence ne concernent que l'intron 0 (pas l'exon 10). Dans une moindre mesure, sur une cohorte de patients atteints de maladie de Parkinson, Coupland et collaborateurs retrouvent également une association entre méthylation de la région de l'exon 0 et âge de début de la maladie de Parkinson. Cependant, les variations mesurées ne sont pas associées avec l'âge des patients et des témoins (Coupland *et al.*, 2013). D'autres études ont aussi rapporté un effet de l'âge sur la méthylation de l'ADN dans les tauopathies (Wang *et al.*, 2008; Bakulski *et al.*, 2012). Cet effet de l'âge concernait les mécanismes généraux de maintenance épigénétique et/ou consistaient en une variabilité plus importante de l'épigénome avec, selon les individus malades, une hyper ou une hypométhylation pour un même site CpG, soit une dérive épigénétique importante chez les malades (Bakulski *et al.*, 2012). De manière intéressante, les variations de la méthylation que nous observons avec l'intron 0 de *MAPT* vont toutes dans le même sens : tous les individus âgés présentent une hypométhylation de l'intron 0. En ce sens, les sites CpG de l'intron 0 pourraient ainsi subir ce que certains auteurs appellent le phénomène "d'horloge épigénétique". L'hypothèse sous-tendue par ce phénomène repose sur l'idée que certains sites CpG spécifiques dans le génome, subissent avec l'âge des changements dans la méthylation d'ADN, qui sont progressifs et communs entre les individus et parfois même les tissus (Horvath, 2013) (pour revue : (Jones *et al.*, 2015)). Ces sites CpG "d'horloge épigénétique" sont particulièrement intéressants et pourraient être des biomarqueurs du vieillissement normal et/ou pathologique et dans le cas des tauopathies être utilisées pour prédire le risque de survenue de la maladie (pour revue : (Teschendorff *et al.*, 2013)). C'est particulièrement le cas pour les tauopathies qui sont le plus souvent des maladies de la personne âgée. Il serait donc important par la suite de poursuivre ces analyses sur un autre tissu plus accessible, comme le sang, afin de déterminer si il est possible de définir de nouveaux biomarqueurs, reflétant la méthylation dans le cerveau, pour prédire notamment la survenue d'une MA.

Hypothèse épigénétique de la PSP

De façon intéressante, dans notre étude, tous les facteurs testés et influençant la survenue de la PSP, agissent de concert sur la méthylation de l'intron 0 de *MAPT*. En effet, la présence du génotype H1/H1, l'âge et la pathologie tau dans la région frontale chez les patients PSP sont tous indépendamment associés à une hypométhylation de la région de

contrôle dans l'intron 0. Il est possible que ces différents facteurs de risque aient des effets cumulatifs sur la méthylation de *MAPT*. Nous nous rapprochons donc des hypothèses récentes tentant d'expliquer la survenue de la sclérose latérale amyotrophique par la conjonction de facteurs génétiques environnementaux (pour revue : (Al-Chalabi & Hardiman. 2013)). Selon cette hypothèse, différents facteurs de risques génétiques (haplotype H1/H2), environnementaux (peut-être l'arsenic ou les métaux lourds) et l'âge concourraient ensemble à modifier l'épigénome d'une proportion croissante de cellules cérébrales. Ces cellules cérébrales présenteraient une expression altérée des ARNm de *MAPT* ce qui provoquerait, au delà d'un seuil de cellules déficientes, l'apparition de la pathologie tau de la PSP (figure 41).

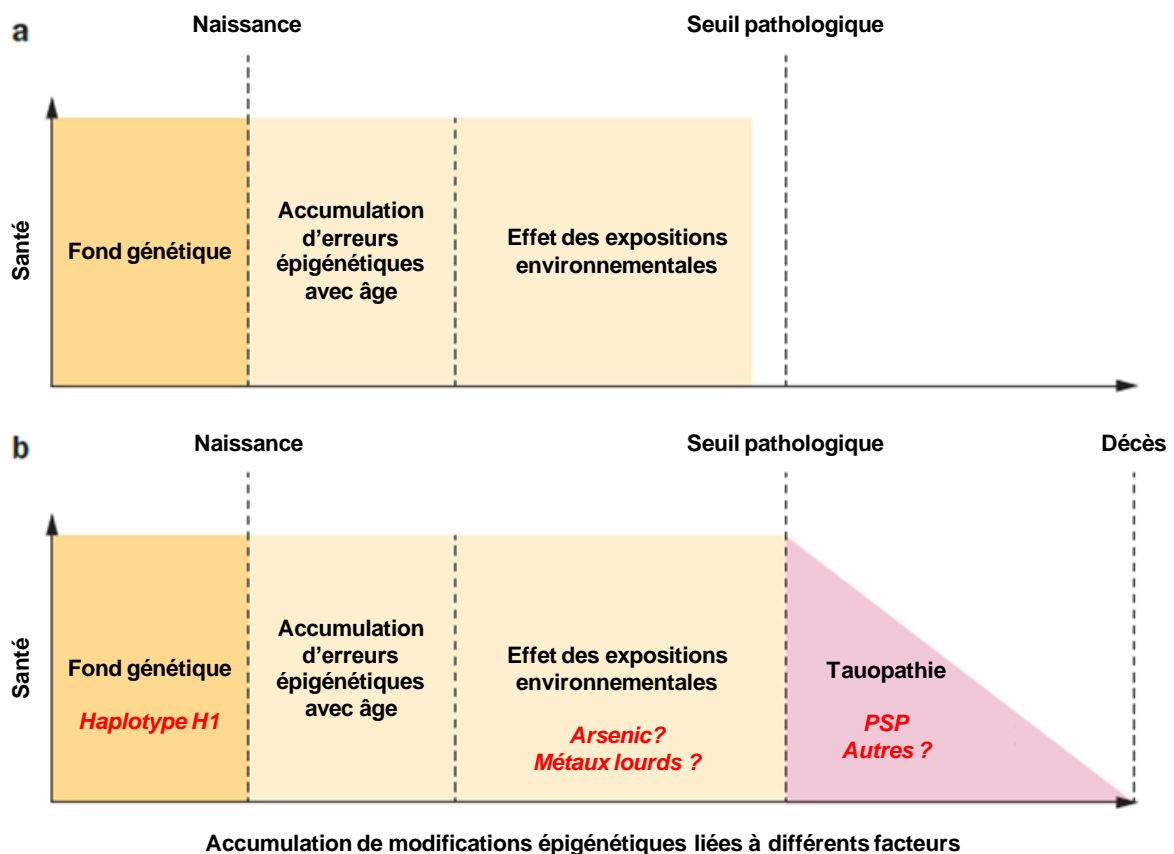


Figure 41 : Hypothèse épigénétique de la PSP.

A. Individu sain. **B.** Individu malade développant une PSP.

D'après Al-Chalabi & Hardiman. 2013

Promoteur alternatif du gène *MAPT*

Analyse bioinformatique

La réalisation de prédictions bioinformatiques fiables pour la recherche des promoteurs de gènes n'est pas une chose aisée. En effet, il existe une quantité de programmes différents, mais tous reposent sur des données établies par rapport à nos connaissances des promoteurs. Ces connaissances restent toutefois insuffisantes, particulièrement dans le cas des promoteurs alternatifs. Les résultats décevants obtenus lors de la prédiction bioinformatique d'un nouveau promoteur ne sont donc pas surprenants et doivent être interprétés avec prudence. L'accumulation de sites putatifs de facteurs de transcription au niveau de la portion 5' de l'exon 0 est par contre très encourageante. Tout particulièrement les facteurs de transcription E2F et YY1 qui peuvent recruter des histones-desacétylases et histones-acétyltransférases pouvant remodeler la compaction de la chromatine et favoriser l'activation ou l'inactivation des régions promotrices (pour revue : (Deng *et al.*, 2010)).

Analyses par qPCR

Nos analyses de qPCR montrent une discordance entre les taux d'ARNm totaux de *MAPT* et les taux d'ARNm issus du promoteur A dans les prélèvements touchés par la pathologie tau par rapport aux témoins. Nous interprétons ces discordances par une surexpression plus importante de transcrits issus d'un promoteur alternatif. A notre connaissance, l'étude des transcrits cérébraux de *MAPT* issus des différents promoteurs n'a jamais été réalisée et constitue une nouvelle piste dans la recherche sur les tauopathies. Mais, il convient de bien prendre en compte les limites de ces analyses. Tout d'abord, nous ne réalisons qu'une analyse indirecte de l'activité du promoteur B dans les tauopathies. Ensuite, il n'est pas possible avec ces différentes qPCR de déterminer les taux respectifs des différents groupes de transcrits. La migration par électrophorèse des produits de 5'RACE-PCR nous permet d'avoir une idée du niveau d'expression des transcrits β et ϵ qui semble minime par rapport à celui des transcrits α . Cependant, cette quantification sur le gel d'agarose est loin d'être précise et ne prend pas en compte les transcrits α qui ne contiennent qu'une petite partie de l'exon 0 et dont la taille peut être équivalente à celle des transcrits β .

Nous avons également corrélé épissage de l'exon 10 et la transcription par le promoteur A. Cependant, nous avons également retrouvé plusieurs transcrits β et ϵ incluant l'exon 10. Il est donc possible que la plus forte corrélation entre l'inclusion de l'exon 10 et l'activité du promoteur A ne soit qu'un artefact lié au fait que les transcrits α issus du

promoteur A soient plus abondants. Néanmoins, nous avons cloné deux transcrits β potentiellement codant et n'incluant pas l'exon 4 qui n'était pas connu comme alternatif. Cela nous permet d'envisager que les transcrits β et ϵ puissent aboutir à des transcrits aberrants, ou présenter un épissage différent.

Analyses par 5'RACE

Le clonage des différentes isoformes de petite taille de *MAPT* obtenues par 5'RACE nous permet de démontrer l'existence dans le tissu cérébral normal et pathologique, de transcrits issus du promoteur B. De plus, certains transcrits codent potentiellement pour des isoformes de protéines tau encore jamais décrites. Plusieurs indices issus de la littérature nous amènent toutefois à penser que ces nouvelles isoformes de protéines tau existent bel et bien. Il a notamment été rapporté dans le cerveau de patients MA, plusieurs fragments de protéines tau ne contenant pas l'ensemble de la région N-terminale (pour revue : (Zilka *et al.*, 2012)). De plus, notre équipe a mis en évidence par des techniques d'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse l'existence de fragments de protéines tau débutant entre autres aux méthionines 11 ou 127 (Derisbourg *et al.*, 2015).

Ces nouveaux transcrits et les éventuelles isoformes qu'ils codent, pourraient avoir un rôle dans la survenue des tauopathies et permettre de faire enfin le lien entre le facteur de risque génétique *MAPT* et la pathologie tau. En effet, plusieurs clones de transcrits β respectent le cadre de lecture et codent potentiellement pour des protéines tau. Ces transcrits β possèdent une région 5'UTR plus courte ce qui pourrait réduire leur demi-vie ou encore les amener à être transportés et traduits dans d'autres compartiments cellulaires. Mais surtout, il nous faut envisager un gain de fonction toxique de ces nouvelles isoformes de protéines tau débutant aux méthionines 11 ou 127. En effet, il a été démontré que les protéines tronquées, suite à des mutations ou des modifications post-traductionnelles, peuvent présenter des modifications importantes de leur structure tridimensionnelle, pouvant finalement conduire à la perte de leur fonction normale et/ou à un gain de fonction toxique. Or, dans la MA, des protéines tau tronquées en Nt et/ou en Ct ont été identifiées dans les filaments de PHF qui représentent le principal constituant de la pathologie neurofibrillaire des tauopathies. Le cœur des PHF est même enrichi en fragments de protéines tau tronquées qui résistent à l'action des protéases ce qui leur donne des caractéristiques proches des protéines prion (Wischik *et al.*, 1988; Novák. 1994). Il est donc tout à fait envisageable que ces nouvelles isoformes protéiques que nous décrivons, et qui sont dépourvues d'une partie de la région N-terminale, puissent avoir un gain de fonction toxique et favoriser l'agrégation

des protéines tau normales, voire même avoir une fonction toxique (comme facteur de nucléation), réalisant les premières étapes de la dégénérescence neurofibrillaire.

Nous avons aussi cloné plusieurs transcrits α de petite taille, ne contenant pas l'ensemble de la séquence de l'exon 0. Ces transcrits sont compatibles à ce qui existe déjà dans les bases de données. Mais ils ajoutent de la complexité à la région promotrice A qui possède donc plusieurs sites d'initiation de la transcription, voire plusieurs promoteurs proches les uns des autres. Les transcrits ϵ qui n'étaient initialement pas attendus présentent aussi différents sites d'initiation de la transcription ce qui laisse penser qu'il existe plusieurs promoteurs alternatifs.

Hypothèse

Les différentes analyses du promoteur alternatif de *MAPT* nous conduisent à penser que dans plusieurs tauopathies, il serait possible d'observer dans le tissu cérébral un switch entre le promoteur A constitutif et le promoteur B alternatif normalement peu actif. Cette dérégulation pourrait correspondre à une activation préférentielle du promoteur B, comme cela semble être le cas dans la PSP, ou en une diminution de l'activité du promoteur A qui serait alors compensée par le promoteur B. Ceci semble compatible avec ce que nous observons dans la MA. Ce promoteur B permettrait la transcription de transcrits plus courts de *MAPT* dont la fonction n'est pas connue à ce jour, mais pouvant aboutir à la synthèse de protéines tau anormales, tronquées dans la région N-terminale et qui, en s'accumulant, pourraient initier la formation de PHF et la pathologie tau.

Perspectives

La description et la caractérisation du promoteur de *MAPT* débouche sur de nombreuses perspectives. Tout d'abord il nous faut encore délimiter avec précision le promoteur B. Pour cela, il nous faut en premier lieu terminer nos analyses de *promoteur luciférase assay*. Ensuite, nous voulons réaliser une série de délétions successives, de taille croissante du promoteur B, dans un vecteur PGL3 pour en tester l'activité luciférase et délimiter de cette manière la région promotrice minimale.

Il serait souhaitable de pouvoir confirmer l'implication comme enhancer ou promoteur de la région de l'intron 0 du gène *MAPT* comprenant la CpG1 et le petit îlot CpG. Cela pourrait être testé en clonant la région de l'îlot CpG de l'intron 0 en aval d'un promoteur B couplé au gène de la luciférase (technique d'*enhancer luciférase assay*).

Nous aimerions aussi tester si les différents promoteurs constitutifs et alternatifs de *MAPT* présentent les mêmes activités selon les haplotypes H1/H2 et les autres variants génétiques de *MAPT*, comme le SNP rs242557, qui ont été décrits comme facteurs de risque des tauopathies.

Enfin, il sera primordial de rechercher et d'analyser ces nouvelles isoformes ("Méthionine 11" et " Méthionine 127") de protéines tau provenant de l'activation d'un promoteur alternatif de *MAPT*. Particulièrement, il serait important de déterminer leurs fonctions physiologiques et pathologiques. Ce travail se rapproche des travaux réalisés au laboratoire par le groupe de Malika Hamdane et nous espérons faire la jonction entre nos deux thèmes de recherche. En effet, ces nouvelles isoformes pourraient être liées à la pathologie et servir de biomarqueurs ou peut-être même être responsables de l'agrégation des protéines tau et permettre de mieux comprendre certaines tauopathies comme la MA. Il serait par exemple intéressant d'envisager la création de vecteurs lentivirus exprimant l'ARNm humain de transcrits β et leur injection guidée par stéréotaxie dans le cerveau de modèle murin de MA.

Conclusion

L'étude des protéines tau ainsi que des mécanismes physiopathologiques des tauopathies est le principal thème de recherche du laboratoire. Mais à l'inverse des précédentes études centrées sur les protéines tau ou sur la génétique de ces maladies, nous avons basé notre travail de thèse sur une hypothèse épignétique des tauopathies. Cette étude inscrite dans une nouvelle thématique pour le laboratoire aura ainsi permis de (1) constituer et caractériser une banque d'échantillons cérébraux de témoins et de patients atteints de différentes tauopathies; (2) démontrer l'existence d'une signature épigénétique spécifique dans le tissu cérébral de patients atteints de PSP. Cela nous a permis aussi de démasquer une nouvelle région du gène *MAPT* que nous suspectons être un promoteur alternatif. (3) Dans un deuxième temps, nous avons étudié et continuons à caractériser ce promoteur alternatif dont les implications dans la pathologie tau pourrait se révéler prometteuses, avec même l'espoir de comprendre enfin comment le gène *MAPT* peut favoriser la survenue de certaines tauopathies.

Bibliographie

A

Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013 Nov;9(11):617–28.

Allen M, Burgess JD, Ballard T, Serie D, Wang X, Younkin CS, et al. Gene expression, methylation and neuropathology correlations at progressive supranuclear palsy risk loci. *Acta Neuropathol*. 2016 Aug;132(2):197–211.

Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS. Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res*. 1995 Sep 11;23(17):3585–93.

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*. 1992 Nov 3;31(43):10626–33.

Andreadis A. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2–3):91–103.

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005 Jun 3;308(5727):1466–9.

B

Baker M, Litvan I, Houlden H, Adamson J, Dickson D, Perez-Tur J, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet*. 1999 Apr;8(4):711–5.

Bakulski KM, Dolinoy DC, Sartor MA, Paulson HL, Konen JR, Lieberman AP, et al. Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis.* 2012;29(3):571–88.

Banack SA, Murch SJ, Cox PA. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J Ethnopharmacol.* 2006 Jun 15;106(1):97–104.

Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *Lancet.* 2015 Oct 24;386(10004):1672–82.

Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Aug;68(8):880–91.

Baylin S, Bestor TH. Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell.* 2002 May;1(4):299–305.

Bennett DA, Yu L, Yang J, Srivastava GP, Aubin C, De Jager PL. Epigenomics of Alzheimer's disease. *Transl Res.* 2015 Jan;165(1):200–20.

Bieberstein NI, Carrillo Oesterreich F, Straube K, Neugebauer KM. First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Rep.* 2012 Jul 26;2(1):62–8.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 1985 Oct;101(4):1371–8.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006 Jul 29;368(9533):387–403.

Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology*. 1997 Nov;49(5):1284–8.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239–59.

Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Aug;33(1):95–130.

Buhule OD, Minster RL, Hawley NL, Medvedovic M, Sun G, Viali S, et al. Stratified randomization controls better for batch effects in 450K methylation analysis: a cautionary tale. *Front Genet*. 2014;5:354.

Burghardt KJ, Pilsner JR, Bly MJ, Ellingrod VL. DNA methylation in schizophrenia subjects: gender and MTHFR 677C/T genotype differences. *Epigenomics*. 2012 Jun;4(3):261–8.

Butner KA, Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol*. 1991 Nov;115(3):717–30.

C

Caffrey TM, Joachim C, Paracchini S, Esiri MM, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of exon 10 at the human MAPT locus. *Hum Mol Genet*. 2006 Dec 15;15(24):3529–37.

Caffrey TM, Wade-Martins R. Functional MAPT haplotypes: bridging the gap between genotype and neuropathology. *Neurobiol Dis*. 2007 Jul;27(1):1–10.

Caillet-Boudin M-L, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener.* 2015;10:28.

Caparros-Lefebvre D, Golbe LI, Deramecourt V, Maurage C-A, Huin V, Buée-Scherrer V, et al. A geographical cluster of progressive supranuclear palsy in northern France. *Neurology.* 2015 Oct 13;85(15):1293–300.

Caparros-Lefebvre D, Sergeant N, Lees A, Camuzat A, Daniel S, Lannuzel A, et al. Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain.* 2002 Apr;125(Pt 4):801–11.

Carrard A, Salzmann A, Malafosse A, Karege F. Increased DNA methylation status of the serotonin receptor 5HTR1A gene promoter in schizophrenia and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2011 Aug;132(3):450–3.

Champy P, Melot A, Guérineau Eng V, Gleye C, Fall D, Höglinger GU, et al. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Mov Disord.* 2005 Dec;20(12):1629–33.

Chapin SJ, Bulinski JC. Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1992;23(4):236–43.

Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 1992 Dec 17;360(6405):674–7.

Chen WT, Liu WK, Yen SH. Expression of tau exon 8 in different species. *Neurosci Lett.* 1994 May 19;172(1–2):167–70.

Cheong J, Yamada Y, Yamashita R, Irie T, Kanai A, Wakaguri H, et al. Diverse DNA methylation statuses at alternative promoters of human genes in various tissues. *DNA Res.* 2006 Aug 31;13(4):155–67.

Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:124.

Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, et al. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging.* 2013 Sep;34(9):2091–9.

Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* 2009 Aug;5(8):e1000602.

Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, et al. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis.* 2001 Feb;8(1):162–72.

Clark LN, Poorkaj P, Wszolek Z, Geschwind DH, Nasreddine ZS, Miller B, et al. 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 USA.* 1998 Oct 27;95(22):13103–7.

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009 Jul;11(7):909–13.

Colaneri A, Wang T, Pagadala V, Kittur J, Staffa NG, Peddada SD, et al. A minimal set of tissue-specific hypomethylated CpGs constitute epigenetic signatures of developmental programming. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e72670.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921–3.

Coupland KG, Mellick GD, Silburn PA, Mather K, Armstrong NJ, Sachdev PS, et al. DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E in vitro. *Mov Disord*. 2014 Nov;29(13):1606–14.

Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci*. 2016 Jan 27;283(1823).

Cui K, Zang C, Roh T-Y, Schones DE, Childs RW, Peng W, et al. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell*. 2009 Jan 9;4(1):80–93.

D

Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci*. 2001 Mar;114(Pt 6):1179–87.

De Jager PL, Srivastava G, Lunnon K, Burgess J, Schalkwyk LC, Yu L, et al. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci*. 2014 Sep;17(9):1156–63.

De Yébenes JG, Sarasa JL, Daniel SE, Lees AJ. Familial progressive supranuclear palsy. Description of a pedigree and review of the literature. *Brain*. 1995 Oct;118 (Pt 5):1095–103.

Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Wattez A, Vermersch P, et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999 Apr 12;52(6):1158–65.

Deng Z, Cao P, Wan MM, Sui G. Yin Yang 1: a multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcription*. 2010 Oct;1(2):81–4.

Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Demeyer D, et al. Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep*. 2015;5:9659.

Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, Theuns J, Rademakers R, Saerens J, et al. A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. *Ann Neurol*. 2004 May;55(5):617–26.

Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*. 2008 Feb 22;319(5866):1086–9.

Doi A, Park I-H, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1350–3.

Dotti CG, Banker GA, Binder LI. 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*. 1987 Oct;23(1):121–30.

Drubin DG, Kirschner MW. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 2):2739–46.

Du J, Zhou N, Liu H, Jiang F, Wang Y, Hu C, et al. Arsenic induces functional re-expression of estrogen receptor α by demethylation of DNA in estrogen receptor-negative human breast cancer. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e35957.

Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, et al. Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet.* 1998 Oct;7(11):1825–9.

Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL. Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2008 Dec;18(6):756–64.

E

Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* 1998 Nov 2;143(3):777–94.

Elizan TS, Chen KM, Mathai KV, Dunn D, Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. A study in non-Chamorro of the Mariana and Caroline Islands. *Arch Neurol.* 1966 Apr;14(4):347–55.

Ennulat DJ, Liem RK, Hashim GA, Shelanski ML. Two separate 18-amino acid domains of tau promote the polymerization of tubulin. *J Biol Chem.* 1989 Apr 5;264(10):5327–30.

F

Fan G, Beard C, Chen RZ, Csankovszki G, Sun Y, Siniiaia M, et al. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J Neurosci*. 2001 Feb 1;21(3):788–97.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997 Oct 22;278(16):1349–56.

Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):433–40.

Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*. 2010 Apr;13(4):423–30.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 Dec 17;366(9503):2112–7.

Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol*. 2014 Jun;117:20–40.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. 2006 Jun;27(2–3):126–39.

Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* 2007 Aug;23(8):413–8.

Fratiglioni L, Mangialasche F, Qiu C. Brain aging: lessons from community studies. *Nutr Rev.* 2010 Dec;68 Suppl 2:S119-127.

G

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Feb;63(2):168–74.

Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015 Feb;41(1):24–46.

Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai S-L, et al. Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. *PLoS Genet.* 2010 May;6(5):e1000952.

Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 1990 Dec;9(13):4225–30.

Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Mar 1;89(5):1983–7.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1989 Oct;3(4):519–26.

Golbe LI, Rubin RS, Cody RP, Belsh JM, Duvoisin RC, Grossmann C, et al. Follow-up study of risk factors in progressive supranuclear palsy. *Neurology*. 1996 Jul;47(1):148–54.

Gu Y, Oyama F, Ihara Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem*. 1996 Sep;67(3):1235–44.

Guo SW. Does higher concordance in monozygotic twins than in dizygotic twins suggest a genetic component? *Hum Hered*. 2001;51(3):121–32.

H

Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, et al. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*. 1994 Jun 9;369(6480):488–91.

Harrow J, Denoeud F, Frankish A, Reymond A, Chen C-K, Chrast J, et al. GENCODE: producing a reference annotation for ENCODE. *Genome Biol*. 2006;7 Suppl 1:S4.1-9.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*. 2007 Mar;39(3):311–8.

Hellman A, Chess A. Extensive sequence-influenced DNA methylation polymorphism in the human genome. *Epigenetics Chromatin*. 2010;3(1):11.

Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, Arepalli S, van der Brug M, Chong S, et al. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet.* 2011 Mar 15;20(6):1164–72.

Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol.* 1989 Apr;9(4):1381–8.

Hirokawa N, Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Mar;6(3):201–14.

Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PMA, Wang L-S, Klei L, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet.* 2011 Jul;43(7):699–705.

Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2015 Feb;16(2):71–84.

Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron.* 2010 Dec 22;68(6):1067–81.

Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* 1998 Jun 18;393(6686):702–5.

I

Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, et al. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*. 2004 Mar 23;62(6):925–31.

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, et al. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron*. 1999 Nov;24(3):751–62.

Iskandar BJ, Rizk E, Meier B, Hariharan N, Bottiglieri T, Finnell RH, et al. Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1603–16.

Ittner LM, Fath T, Ke YD, Bi M, van Eersel J, Li KM, et al. Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Oct 14;105(41):15997–6002.

Ittner LM, Götz J. Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Feb;12(2):65–72.

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010 Aug 6;142(3):387–97.

Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, et al. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb 1;23(3):648–56.

J

Jakovcevski M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1194–204.

Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*. 2008 Jun 12;58(5):681–93.

Jiang Y, Matevossian A, Huang H-S, Straubhaar J, Akbarian S. Isolation of neuronal chromatin from brain tissue. *BMC Neurosci*. 2008;9:42.

Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*. 2015 Dec;14(6):924–32.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415–28.

Joseph J. Twin studies in psychiatry and psychology: science or pseudoscience? *Psychiatr Q*. 2002;73(1):71–82.

Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013 Sep 5;501(7465):45–51.

K

Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, et al. Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Jun 16;112(24):7501–6.

Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Sep;10(9):698–712.

Katsuse O, Lin W-L, Lewis J, Hutton ML, Dickson DW. Neurofibrillary tangle-related synaptic alterations of spinal motor neurons of P301L tau transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2006 Dec 1;409(2):95–9.

Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A. Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*. 2000 Jun 13;54(11):2072–7.

Kawashima M, Miyake M, Kusumi M, Adachi Y, Nakashima K. Prevalence of progressive supranuclear palsy in Yonago, Japan. *Mov Disord*. 2004 Oct;19(10):1239–40.

Ke YD, Suchowerska AK, van der Hoven J, De Silva DM, Wu CW, van Eersel J, et al. Lessons from tau-deficient mice. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:873270.

Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res*. 2006 Jan;16(1):55–65.

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006 Feb;31(2):89–97.

Koffie RM, Hyman BT, Spires-Jones TL. Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol Neurodegener*. 2011;6(1):63.

Kouri N, Carlomagno Y, Baker M, Liesinger AM, Caselli RJ, Wszolek ZK, et al. Novel mutation in MAPT exon 13 (p.N410H) causes corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 2014 Feb;127(2):271–82.

Kouri N, Ross OA, Dombroski B, Younkin CS, Serie DJ, Soto-Ortolaza A, et al. Genome-wide association study of corticobasal degeneration identifies risk variants shared with progressive supranuclear palsy. *Nat Commun.* 2015;6:7247.

Kovacs GG. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2).

Kovacs GG. Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015 Feb;41(1):3–23.

Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 2002 Oct 16;299(1–2):1–34.

Kulis M, Queirós AC, Beekman R, Martín-Subero JI. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Nov;1829(11):1161–74.

Kwok JBJ, Teber ET, Loy C, Hallupp M, Nicholson G, Mellick GD, et al. Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2004 Mar;55(3):329–34.

L

Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010 Mar;11(3):191–203.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1452–8.

Landry J-R, Mager DL, Wilhelm BT. Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. *Trends Genet.* 2003 Nov;19(11):640–8.

Lannuzel A, Michel PP, Höglinger GU, Champy P, Jousset A, Medja F, et al. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience.* 2003;121(2):287–96.

Lannuzel A, Höglinger GU, Verhaeghe S, Gire L, Belson S, Escobar-Khondiker M, et al. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain.* 2007 Mar;130(Pt 3):816–27.

Lee M, McGeer PL. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement β -alanine. *Neurobiol Aging.* 2012 Jul;33(7):1440–7.

Leroy O, Wang J, Maurage C-A, Parent M, Cooper T, Buée L, et al. Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr;1762(4):460–7.

Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science.* 1988 Nov 11;242(4880):936–9.

Li Y, Chen JA, Sears RL, Gao F, Klein ED, Karydas A, et al. An epigenetic signature in peripheral blood associated with the haplotype on 17q21.31, a risk factor for neurodegenerative tauopathy. *PLoS Genet.* 2014 Mar;10(3):e1004211.

Liu D, Wu D, Zhao L, Yang Y, Ding J, Dong L, et al. Arsenic Trioxide Reduces Global Histone H4 Acetylation at Lysine 16 through Direct Binding to Histone Acetyltransferase hMOF in Human Cells. *PLoS ONE.* 2015;10(10):e0141014.

Llamas B, Holland ML, Chen K, Cropley JE, Cooper A, Suter CM. High-resolution analysis of cytosine methylation in ancient DNA. *PLoS ONE.* 2012;7(1):e30226.

Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology.* 2000;54(11 Suppl 5):S4-9.

Logette E, Wotawa A, Solier S, Desoche L, Solary E, Corcos L. The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene.* 2003 Feb 13;22(6):935–46.

Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI. Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Nov;87(21):8422–6.

Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci.* 2008 Oct 15;28(42):10576–86.

Lunnon K, Smith R, Hannon E, De Jager PL, Srivastava G, Volta M, et al. Methylomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2014 Sep;17(9):1164–70.

Luo M-H, Leski ML, Andreadis A. Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J Cell Biochem.* 2004 Apr 1;91(5):880–95.

M

Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow E-M. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2007 Jan;17(1):83–90.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009 Oct 8;461(7265):747–53.

Marchese FP, Huarte M. Long non-coding RNAs and chromatin modifiers: their place in the epigenetic code. *Epigenetics.* 2014 Jan;9(1):21–6.

Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging.* 2010 Dec;31(12):2025–37.

Mastroeni D, McKee A, Grover A, Rogers J, Coleman PD. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS ONE.* 2009;4(8):e6617.

Maurage C-A, Bussi re T, Sergeant N, Ghesteem A, Figarella-Branger D, Ruchoux M-M, et al. Tau aggregates are abnormally phosphorylated in inclusion body myositis and have an immunoelectrophoretic profile distinct from other tauopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004 Dec;30(6):624–34.

Migliore L, Coppedè F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res.* 2009 Jul 10;667(1–2):82–97.

Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.* 2008 May;89(4):599–603.

Mills JD, Nalpathamkalam T, Jacobs HIL, Janitz C, Merico D, Hu P, et al. RNA-Seq analysis of the parietal cortex in Alzheimer's disease reveals alternatively spliced isoforms related to lipid metabolism. *Neurosci Lett.* 2013 Mar 1;536:90–5.

Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, et al. Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem.* 2012 Sep 14;287(38):32040–53.

Montes M, Becerra S, Sánchez-Álvarez M, Suñé C. Functional coupling of transcription and splicing. *Gene.* 2012 Jun 15;501(2):104–17.

Morfini G, Pigino G, Mizuno N, Kikkawa M, Brady ST. Tau binding to microtubules does not directly affect microtubule-based vesicle motility. *J Neurosci Res.* 2007 Sep;85(12):2620–30.

Morris HR, Baker M, Yasojima K, Houlden H, Khan MN, Wood NW, et al. Analysis of tau haplotypes in Pick's disease. *Neurology.* 2002 Aug 13;59(3):443–5.

Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, et al. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 2009 Feb 17;7(2):e34.

Mylonas E, Hascher A, Bernadó P, Blackledge M, Mandelkow E, Svergun DI. Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering. *Biochemistry*. 2008 Sep 30;47(39):10345–53.

N

Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, Morris HR, Wood NW, Lees AJ, et al. The prevalence of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) in the UK. *Brain*. 2001 Jul;124(Pt 7):1438–49.

Neumann M, Schulz-Schaeffer W, Crowther RA, Smith MJ, Spillantini MG, Goedert M, et al. Pick's disease associated with the novel Tau gene mutation K369I. *Ann Neurol*. 2001 Oct;50(4):503–13.

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. 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*. 1986 Dec;387(3):271–80.

Nicholl DJ, Greenstone MA, Clarke CE, Rizzu P, Crooks D, Crowe A, et al. An English kindred with a novel recessive tauopathy and respiratory failure. *Ann Neurol*. 2003 Nov;54(5):682–6.

Nicolas G, Charbonnier C, Wallon D, Quenez O, Bellenguez C, Grenier-Boley B, et al. SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2016 Jun;21(6):831–6.

Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2013;4:83.

Noh Y, Jeon S, Lee JM, Seo SW, Kim GH, Cho H, et al. Anatomical heterogeneity of Alzheimer disease: based on cortical thickness on MRIs. *Neurology*. 2014 Nov 18;83(21):1936–44.

Novák M. Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease. *Acta Virol*. 1994 Jun;38(3):173–89.

Nunez J, Fischer I. Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J Mol Neurosci*. 1997 Jun;8(3):207–22.

O

Ounallah-Saad H, Beerli R, Goshen I, Yirmiya R, Renbaum P, Levy-Lahad E. Transcriptional regulation of the murine Presenilin-2 gene reveals similarities and differences to its human orthologue. *Gene*. 2009 Oct 15;446(2):81–9.

P

Pardo LM, Rizzu P, Francescatti M, Vitezic M, Leday GGR, Sanchez JS, et al. Regional differences in gene expression and promoter usage in aged human brains. *Neurobiol Aging*. 2013 Jul;34(7):1825–36.

Pastor P, Moreno F, Clarimón J, Ruiz A, Combarros O, Calero M, et al. MAPT H1 Haplotype is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease Risk in APOE ϵ 4 Noncarriers: Results from the Dementia Genetics Spanish Consortium. *J Alzheimers Dis*. 2015;49(2):343–52.

Paul S, Giri AK. Epimutagenesis: A prospective mechanism to remediate arsenic-induced toxicity. *Environ Int*. 2015 Aug;81:8–17.

Pecci A, Viegas LR, Baranao JL, Beato M. Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21062–9.

Piguet O, Halliday GM, Reid WGJ, Casey B, Carman R, Huang Y, et al. Clinical phenotypes in autopsy-confirmed Pick disease. *Neurology.* 2011 Jan 18;76(3):253–9.

Pittman AM, Myers AJ, Duckworth J, Bryden L, Hanson M, Abou-Sleiman P, et al. The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 2004 Jun 15;13(12):1267–74.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 1998 Jun;43(6):815–25.

Poorkaj P, Muma NA, Zhukareva V, Cochran EJ, Shannon KM, Hurtig H, et al. An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol.* 2002 Oct;52(4):511–6.

Q

Quon G, Lippert C, Heckerman D, Listgarten J. Patterns of methylation heritability in a genome-wide analysis of four brain regions. *Nucleic Acids Res.* 2013 Feb 1;41(4):2095–104.

R

Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature.* 2011 Feb 10;470(7333):279–83.

Rademakers R, Melquist S, Cruts M, Theuns J, Del-Favero J, Poorkaj P, et al. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov 1;14(21):3281–92.

Ramaroson H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues J-F, PAQUID. [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev Neurol (Paris).* 2003 Apr;159(4):405–11.

Rapport OPES : N° 2454 - Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé (Mme Cécile Gallez) [Internet]. [cited 2016 Sep 16]. Available from: <http://www.assemblee-nationale.fr/12/rap-off/i2454.asp>

Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014 Apr 15;88(4):640–51.

Renbaum P, Beeri R, Gabai E, Amiel M, Gal M, Ehrengruber MU, et al. Egr-1 upregulates the Alzheimer's disease presenilin-2 gene in neuronal cells. *Gene.* 2003 Oct 30;318:113–24.

Respondek G, Stamelou M, Kurz C, Ferguson LW, Rajput A, Chiu WZ, et al. The phenotypic spectrum of progressive supranuclear palsy: a retrospective multicenter study of 100 definite cases. *Mov Disord.* 2014 Dec;29(14):1758–66.

Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, et al. Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):18177–86.

Rhein M, Hagemeyer L, Klitschar M, Muschler M, Bleich S, Frieling H. DNA methylation results depend on DNA integrity-role of post mortem interval. *Front Genet.* 2015;6:182.

Ridge PG, Mukherjee S, Crane PK, Kauwe JSK, Alzheimer's Disease Genetics Consortium. Alzheimer's disease: analyzing the missing heritability. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e79771.

Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S10-17.

Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1839(8):627–43.

Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jun 7;102(23):8315–20.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* 2006 Jan;38(1):24–6.

Ryman DC, Acosta-Baena N, Aisen PS, Bird T, Danek A, Fox NC, et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2014 Jul 15;83(3):253–60.

S

Schoenfeld TA, Obar RA. Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol.* 1994;151:67–137.

Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet*. 1999 Nov 20;354(9192):1771–5.

Schrötter A, Pfeiffer K, El Magraoui F, Platta HW, Erdmann R, Meyer HE, et al. The amyloid precursor protein (APP) family members are key players in S-adenosylmethionine formation by MAT2A and modify BACE1 and PSEN1 gene expression-relevance for Alzheimer's disease. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Nov;11(11):1274–88.

Schwartz YB, Pirrotta V. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nat Rev Genet*. 2013 Dec;14(12):853–64.

Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Wattez A, et al. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*. 2001 Sep 15;10(19):2143–55.

Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, et al. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics*. 2008 Apr;5(2):207–24.

Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, et al. Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2012 Feb 15;32(7):2430–41.

Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Figurski M, Coart E, Blennow K, et al. Qualification of the analytical and clinical performance of CSF biomarker analyses in ADNI. *Acta Neuropathol*. 2011 May;121(5):597–609.

Shoemaker R, Deng J, Wang W, Zhang K. Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. *Genome Res*. 2010 Jul;20(7):883–9.

Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. 2011 Nov 3;479(7371):74–9.

Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1308–12.

Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci*. 2006 May 15;119(Pt 10):2025–34.

Souter S, Lee G. Microtubule-associated protein tau in human prostate cancer cells: isoforms, phosphorylation, and interactions. *J Cell Biochem*. 2009 Oct 15;108(3):555–64.

Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol*. 2013 Jun;12(6):609–22.

Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jun 23;95(13):7737–41.

Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014 May 21;82(4):756–71.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E-M. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol*. 2002 Mar 18;156(6):1051–63.

Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, et al. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4566–75.

Sun Z, Cunningham J, Slager S, Kocher J-P. Base resolution methylome profiling: considerations in platform selection, data preprocessing and analysis. *Epigenomics*. 2015 Aug;7(5):813–28.

Sündermann F, Fernandez M-P, Morgan RO. An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau. *BMC Genomics*. 2016;17:264.

Sutherland JE, Costa M. Epigenetics and the environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Mar;983:151–60.

T

Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 2002 Jun 14;296(5575):1991–5.

Teschendorff AE, West J, Beck S. Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum Mol Genet*. 2013 Oct 15;22(R1):R7–15.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1791–800.

Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, et al. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development*. 2009 Sep;136(18):3131–41.

Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Ukitsu M, Genda Y. The methylation status of cytosines in a tau gene promoter region alters with age to downregulate transcriptional activity in human cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 1999 Nov 12;275(2):89–92.

Trabzuni D, Wray S, Vandrovcova J, Ramasamy A, Walker R, Smith C, et al. MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet*. 2012 Sep 15;21(18):4094–103.

Tsuji JS, Garry MR, Perez V, Chang ET. Low-level arsenic exposure and developmental neurotoxicity in children: A systematic review and risk assessment. *Toxicology*. 2015 Nov 4;337:91–107.

Twine NA, Janitz K, Wilkins MR, Janitz M. Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2011;6(1):e16266.

V

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 Aug;119 (Pt 4):1123–36.

Violet M, Chauderlier A, Delattre L, Tardivel M, Chouala MS, Sultan A, et al. Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Dis*. 2015 Oct;82:540–51.

Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, et al. A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:84.

von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 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 USA*. 2000 May 9;97(10):5129–34.

Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, et al. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science*. 2010 Oct 8;330(6001):198.

W

Wade-Martins R. Genetics: The MAPT locus-a genetic paradigm in disease susceptibility. *Nat Rev Neurol*. 2012 Sep;8(9):477–8.

Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, et al. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull*. 2016 Mar;42(2):406–14.

Wang M, Weiss M, Simonovic M, Haertinger G, Schrimpf SP, Hengartner MO, et al. PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Aug;11(8):492–500.

Wang S-C, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2698.

Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci*. 2016 Jan;17(1):5–21.

Wei ML, Andreadis A. Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J Neurochem*. 1998 Apr;70(4):1346–56.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975 May;72(5):1858–62.

West RL, Lee JM, Maroun LE. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci*. 1995;6(2):141–6.

Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ, et al. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain*. 2007 Jun;130(Pt 6):1566–76.

Williams DR, Lees AJ. Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges. *Lancet Neurol*. 2009 Mar;8(3):270–9.

Winter Y, Bezdolnyy Y, Katunina E, Avakjan G, Reese JP, Klotsche J, et al. Incidence of Parkinson's disease and atypical parkinsonism: Russian population-based study. *Mov Disord*. 2010 Feb 15;25(3):349–56.

Wischik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, et al. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Jun;85(12):4506–10.

X

Xu W, Tan L, Wang H-F, Jiang T, Tan M-S, Tan L, et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2015 Dec;86(12):1299–306.

Y

Yamamoto Y, Mizuno R, Nishimura T, Ogawa Y, Yoshikawa H, Fujimura H, et al. Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J Biol Chem*. 1994 Dec 16;269(50):31725–30.

Yegambaram M, Manivannan B, Beach TG, Halden RU. Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's disease: a review. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(2):116–46.

Yoshida M. Astrocytic inclusions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neuropathology*. 2014 Dec;34(6):555–70.

Yu C-E, Cudaback E, Foraker J, Thomson Z, Leong L, Lutz F, et al. Epigenetic signature and enhancer activity of the human APOE gene. *Hum Mol Genet*. 2013 Dec 15;22(24):5036–47.

Z

Zhukareva V, Mann D, Pickering-Brown S, Uryu K, Shuck T, Shah K, et al. Sporadic Pick's disease: a tauopathy characterized by a spectrum of pathological tau isoforms in gray and white matter. *Ann Neurol*. 2002 Jun;51(6):730–9.

Zilka N, Kovacech B, Barath P, Kontseikova E, Novák M. The self-perpetuating tau truncation circle. *Biochem Soc Trans*. 2012 Aug;40(4):681–6.

Annexes

ANNEXE 1 : Base de prélèvements cérébraux humain

Code Patient	Sexe	Age au décès	PMI (t)	Cause Décès	Cause de l'autopsie	Stade Braak	Diagnostic neuropathologique	Date d'examen IAD		Age	HN12	HNc	Date d'examen AN		F	O	RN	O	Extension Prédécédée
								F	O				F	O					
G2-1042	M	91	32	Syphilis + SNUV	1	Brain 3	Lésions ischémiques diffuses sans interface corticale, lésions types Alzheimer	31/07/2013	31/07/2013	E3/E3	HN1H	G0	30/07/2014	30/07/2014	7,9	2,9	2,9	OUI	
G6-2031	M	95	17	Pneumonie bactérienne	1	Brain 3	Lésions diffuses chroniques dans le cortex gris cortical et substance blanche sans corrélat associé à des lésions de type Alzheimer	07/08/2013	07/08/2013	E3/E3	HN1H	G0	20/11/2014	20/11/2014	5,1	2,7	2,7	OUI	
G3-1471	F	82	49	Cancer colo-rectal métastatique en post-opératoire	1	Brain 3-4	Diagnostique lésions neurofibrillaires de type sénile chronique et de lésions NF et de type amyloïde	23/07/2013	03/07/2013	E3/E3	HN1H	A0	20/11/2014	20/11/2014	5,6	3,3	3,3	OUI	
G3-1424	F	89	16	ASB	1	Brain 4	Lésions de MA, Braak IV et de type amyloïde associées. Un peu vascularisées (sans Braak) - un bon cas de surcharge "transmission"	29/07/2013	20/07/2013	E3/E3	HN1H	AA	30/10/2014	30/10/2014	4,9	6	6	OUI	
G3-28	M	91	9	2001	1	Brain 3	MA	01/07/2014	01/07/2014	E3/E3	HN1H	A0	14/11/2014	14/11/2014	3,7	2,2	2,2	OUI	
G3-66	F	90	4	1996	1	Brain 4	MA	27/08/2014	27/08/2014	E3/E3	HN1H	A0	10/11/2014	10/11/2014	7,6	6,3	6,3	OUI	
G7-73	F	92	4	1995	1	Brain 3	MA	03/07/2013	03/07/2013	E3/E3	HN1H2	A0	10/11/2014	10/11/2014	6,7	6,3	6,3	OUI	
G8-89	M	68	6	2001	1	Brain 4	MA	03/07/2013	03/07/2013	E3/E4	HN1H2	A0	10/11/2014	10/11/2014	5,7	7,9	7,9	OUI	
P704	F	76	28	NC	1	Brain 4	MA	03/07/2013	03/07/2013	E3/E3	HN1H2	G0	10/11/2014	10/11/2014	6,9	7,1	7,1	OUI	
G6-2548	M	80	6	Maladie d'Alzheimer (DCL-Kovalev)	1	Brain 6	Maladie d'Alzheimer évoluée	2010		E3/E4	HN1H2	A0							
G7-0923	F	81	18	MA (forme 1988, aggraver à un premier à un DCL)	1	Brain 5	Maladie d'Alzheimer prédominante à lésions de type amyloïde associées (sans Braak) - un bon cas de surcharge "transmission"	2010		E3/E3	HN1H2	G0							
G7-2028	F	77	15	NC	1	Brain 6	MA + quelques corps de Lewy	29/04/2013	20/04/2013	E3/E4	HN1H	AA	30/10/2014	30/10/2014	6	6,5	6,5	OUI	
G7-2021	F	80	5	Etat de mal épileptique, EP bilatérale	1	Brain 6	Lésions Alzheimer + présence de nombreuses lésions vasculaires disséminées NC	29/04/2013	29/04/2013	E3/E4	HN1H	AA	30/10/2014	30/10/2014	5,9	5,8	5,8	OUI	
G7-2003	F	69	20	MA probable forme précoce	1	Brain 5	Maladie d'Alzheimer évoluée	2010		E3/E4	HN1H	G0							
G7-2028	M	70	7	Probable forme précoce	1	Brain 6	Maladie d'Alzheimer évoluée + multiples microcavités du cortex gris cortical	2010		E3/E3	HN1H2	A0							
G3-0206	M	86	10	NC	1	Brain 6	Maladie d'Alzheimer évoluée - lésions modérées d'angéiopathie amyloïde	29/04/2013	29/04/2013	E2/E4	HN1H2	A0	28/04/2014	28/04/2014	6,8	7	7	OUI	
G3-1048	M	62	10	NC	1	Brain 5	MA + hyperplasie des plexus vasculaires sans AA	04/09/2013	04/09/2013	E3/E3	HN1H2	G0	28/04/2014	28/04/2014	7,3	6,3	6,3	OUI	
G3-2013	F	86	8	Démence post-infectieuse	1	Brain 6	Démence à lésions associées à une MA et à des lésions vasculaires disséminées et un infarctus systémique profond sans étiologie	23/07/2013	20/07/2013	E3/E3	HN1H2	G0	30/10/2014	30/10/2014	4,7	6,2	6,2	OUI	
G3-2017	F	86	10	NC	1	Brain 6	Démence à lésions associées à une MA et à des lésions vasculaires disséminées et un infarctus systémique profond sans étiologie	28/07/2013	20/07/2013	E4/E4	HN1H	A0	30/10/2014	30/10/2014	2,4	2,9	2,9	OUI	
G3-2012	F	89	24	MA suspicion Charcot-Jaco	1	Brain 5-6	MA de type postérieur - Pas d'argument CJD	31/07/2013	31/07/2013	E3/E3	HN1H	A0	29/04/2014	29/04/2014	6,1	6,1	6,1	OUI	
G3-2005	M	57	23	NC	1	Brain 6	MA de type postérieur - Pas d'argument CJD	24/12/2012	07/02/2013	E3/E3	HN1H2	G0	28/04/2014	28/04/2014	6,9	7,6	7,6	OUI	
G3-2011	F	69	6	Complications de lésions	1	Brain 6	Lésions Alzheimer sévères + angéiopathie amyloïde sévère stade 3, Thal 4	08/09/2013	08/09/2013	E2/E3	HN1H2	A0	28/04/2014	28/04/2014	5,2	4,1	4,1	OUI	
G3-2020	M	78	10	Hémorragie intracraniale + aggr. V	1	Brain 5	Angéiopathie amyloïde sévère stade 3 Thal 4 multiples lésions vasculaires chroniques associées à des lésions Alzheimer Thal 5	07/09/2013	08/09/2013	E4/E4	HN1H2	G0	08/11/2014	08/11/2014	7,6	2,9	2,9	OUI	
G3-2014	F	73	22	NC	1	Brain 6	MA sévère + angéiopathie amyloïde + lésions vasculaires sévères et chroniques. Démence	28/07/2013	20/07/2013	E3/E4	HN1H2	G0	31/07/2014	31/07/2014	6,8	4	4	OUI	
G3-2014	F	98	34	MA évoluée + lésions vasculaires postérieures	1	Brain 6	MA + angéiopathie amyloïde + lésions vasculaires, Thal 5			E3/E3	HN1H	A0							
G1-0400	F	72	5,5	Sépsémie	1	Brain 6	MA + lésions vasculaires + angéiopathie amyloïde modérée, Thal 5	06/09/2013	06/09/2013	E3/E4	HN1H2	G0	28/04/2014	28/04/2014	4,4	4,5	4,5	OUI	
G1-2418	M	67	9,5	APR	1	Brain 6	MA sévère	07/08/2013	07/08/2013	E3/E4	HN1H	A0	28/04/2014	28/04/2014	7,8	6,1	6,1	OUI	
G1-2601	M	65	36	NC	1	Brain 6	MA	31/07/2013	31/07/2013	E3/E4	HN1H2	G0	28/04/2014	28/04/2014	7,3	4,3	4,3	OUI	

C12-00812	F	61	17		Chêne glandifère buccal	1	Brake 6	MA + angopone amyloide déposée dans les aréoles, réaction chronique cortico- réfractaire (HIV2003)	24/07/2013	24/07/2013	E3E3	HIH2	AG	31/03/2014	31/03/2014	7.1	2.6	Ou
C12-02047	F	63	3		DNA sur système de glissement	1	Brake 6	MA + Angopone amyloide saïles compliquée de multiples lésions inflammatoires et fibroscitiques corticales et sous-corticales	07/02/2013	07/02/2013	E3E4	HIH2	AG	31/03/2014	31/03/2014	7.7	5.2	Ou
C12-0400	H	69	20		NC	1	Brake 5	Mauvaise dentition avec complication à genre angopone sur du tissu de lésions temporales temporaires	06/02/2013	06/02/2013	E3E4	HIH1	AG	28/02/2014	28/02/2014	6.2	4.3	Ou
C12-0400	M	63	4		NC	1	Brake 6	Mauvaise dentition du sujet jeune + Angopone amyloïde saïles	24/07/2013	24/07/2013	E3E4	HIH1	GG	31/03/2014	31/03/2014	6.3	5.7	Ou
C12-0407	M	68	6		ACR	1	Brake 6	MA, type varié, temporaire	01/02/2013	01/02/2013	E3E3	HIH1	AG	28/02/2014	28/02/2014	2	3	Ou
G 109	F	92	7		1914	1	Brake 5	MA	27/06/2014	27/06/2014	E3E3	HIH1	AA	06/11/2014	06/11/2014	6.9	6.1	Ou
G 2	M	67	7		2003	1	Brake 5	MA	27/06/2014	27/06/2014	E3E4	HIH2	AG	06/11/2014	06/11/2014	4	3.3	Ou
C08-0472	M	66	17		NC	2	CBD	Lésions de l'angopone normale et glabrous acquises en CCB	30/02/2013	30/02/2013	E3E4	HOH2	GG	22/01/2014	22/01/2014	3.8	2.6	Ou
C08-0824	F	75	7		NC	2	CBD	Lésions de l'angopone normale et glabrous acquises en CCB + lésions de l'angopone cortico-corticales + lésions de l'angopone cortico-basales (microcorticales)	01/03/2013	01/03/2013	E3E3	HIH1	AA	28/02/2014	28/02/2014	6.1	7	Ou
C08-0877	M	76	19		DNA	2	CBD	Lésions de l'angopone normale et glabrous acquises en CCB + lésions de l'angopone cortico-basales (microcorticales)	30/02/2013	30/02/2013	E3E4	HIH2	AG	22/01/2014	22/01/2014	4	3.4	Ou
C08-2872	M	71	5		DNA	2	CBD	Lésions de l'angopone cortico-basales	23/07/2013	24/07/2013	E3E3	HIH1	GG	28/02/2014	28/02/2014	6.8	7.6	Ou
G 1	M	69	2		2003	2	CBD	CBD	23/06/2014	23/06/2014	E3E3	HIH1	GG	14/11/2014	14/11/2014 + 28/02/2014	6.3	2.6	Ou
F 423	M	69	29		NC	2	CBD	CBD + l'angopone	23/06/2014	23/06/2014	E3E3	HIH2	GG	14/11/2014	14/11/2014	2.8	2.2	Ou
F 583	F	72	15		NC	2	CBD	CBD + l'angopone saïles	01/07/2014	01/07/2014	HIH1	AG		20/11/2014				
F 723	M	77	NC		NC	2	CBD	CBD + Brake 3	01/07/2014	01/07/2014	E3E3	HIH1	GG	19/11/2014	19/11/2014	4.3	5.3	Ou
F 732	M	74	23		NC	2	CBD	CBD	01/07/2014	01/07/2014	E3E3	HIH1	AG	18/11/2014	18/11/2014	2.5	2.1	Ou
F 821	F	81	33		NC	2	CBD	CBD + l'angopone saïles	03/07/201	03/07/201	E3E4	HIH1	GG	10/11/2014	10/11/2014	6.7	3.8	Ou
C07-0106	M	67	20		NC	2	PSP	Triangulaire associée lésions neuronales et astrocytaires, de topographie corticale avec une PSP	23/02/2013	23/02/2013	E3E3	HIH1	AG	26/01/2014	26/01/2014	5.6	3.2	Ou
C08-0469	F	77	17		NC	2	PSP	Lésions en bande PSP - Lésions associées des formes type lacunes + lésions Alzheimer	23/07/2013	24/07/2013	E3E3	HIH1	AG	21/01/2014	21/01/2014	6.1	6.6	Ou
C08-0734	M	66	18		NC	2	PSP	PSP	24/07/2013	26/07/2013	E3E3	HIH2	AG	21/01/2014	21/01/2014	6.2	7.2	Ou
C08-1182	M	62	4.5		NC	2	PSP	PSP + lésions tuberculiques multiples et disséminées dans la région CCA, avec Alzheimer + apoptose neuronale pour du corps olivaire + mortelle de l'apoptose de l'apoptose du cortex olivaire	03/12/2014	03/12/2014	E3E3	HIH1	AA	28/02/2014	28/02/2014	2	3.3	Ou
C10-0030	F	82	11		NC	2	PSP	PSP	24/07/2013	24/07/2013	E3E3	HIH1	AA	22/01/2014	22/01/2014	6.5	4.2	Ou
C10-0384	F	77	24		NC	2	PSP	PSP	26/07/2013	07/08/2013	E3E4	HIH1	GG	22/01/2014	22/01/2014	6.8	8.7	Ou
C10-0893	F	77	9		NC	2	PSP	PSP	03/12/2014	03/12/2014	E3E3	HIH1	AG	28/02/2014	28/02/2014	3.8	2	Ou
C11-0480	M	67	9		NC	2	PSP	PSP avec une forte prédominance des lésions sous-corticales, pas de lésions du cortex frontal	03/12/2014	03/12/2014	E3E4	HIH1	AG	28/02/2014	28/02/2014	4.4	3.1	Ou
C13-0380	F	74	17		ACR	2	PSP	PSP + lésions lacunaires chroniques	03/12/2014	03/12/2014	E3E3	HIH1	AG	28/02/2014	28/02/2014	3.8	4.8	Ou
C13-0732	F	77	16		NC	2	PSP	PSP + lésions lacunaires	11/02/2016	11/02/2016	HIH2	GG						

CH-2618	M	80	3	NC		2	PSP		PSP Bank 2, Thir 4	11/09/2016	11/09/2016		HHH2	GG					
CH-2619	M	73	9	Hébergement sur plateforme d'admission		2	PSP		PSP Bank 1, Thir 1	11/09/2016	11/09/2016		HHH2	AG					
CH-0029	M	89	38	NC		2	PSP		PSP Hébergement, Thir 2	14/09/2016	14/09/2016		HHH2	AG					
P-1179	F	70	22	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	AG					
P-310	F	68	24	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	AA					
P-314	M	76	7	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH2	AG					
P-408	M	78	31,5	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	AA					
P-417	M	70	NC	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	AA					
P-420	M	77	22	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	GG					
P-427	M	59	NC	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	AA					
P-471	M	84	NC	NC		2	PSP		PSP	04/09/2013	04/09/2013		HHH1	AG					
P-5013	F	72	NC	NC		2	PSP		PSP	14/09/2016	14/09/2016		HHH1	AA					
P-728	M	71	NC	NC		2	PSP		PSP	23/09/2014	23/09/2014		HHH1	AG					
P-722	F	80	22	NC		2	PSP		PSP	23/09/2014	23/09/2014		HHH2	GG					
P-801	M	72	38	NC		2	PSP		PSP	23/09/2014	23/09/2014		HHH1	AG					
P-818	F	72	20	NC		2	PSP		PSP	23/09/2014	23/09/2014		HHH2	AG					
P-826	F	67	NC	NC		2	PSP		PSP	01/09/2014	01/09/2014		HHH1	GG					
CH-0152	M	57	22	DLA / NRP inclusion		3	Poa		Maintenance PoC, système de gestion	04/09/2013	04/09/2013		HHH1	AA					
CH-21706	M	71	21	NC		3	Poa		CDT associée à des stations hémodynamiques et à des pompes par un microscopie Thir 1/TPP	06/09/2013	06/09/2013		HHH2	GG					
CH-0840	F	88	11	Centre de suivi néphrologique		3	Poa		DLT avec inclusion de module au TPP 17, liaison CSC patient-critiques dans un environnement à des technologies de suivi de patient	09/09/2013	09/09/2013		HHH2	AG					
CH-31165	M	68	15	AEG		3	Poa		DLT	31/07/2013	31/07/2013		HHH1	GG					
P-2828	M	60	NC	NC		3	Poa		Maintenance PoC, système de gestion	23/09/2014	23/09/2014		HHH2	GG					
P-826	F	67	NC	NC		3	Poa		Maintenance PoC, système de gestion	01/09/2014	01/09/2014		HHH1	GG					
CH-0177	M	72	7	Admission patients		T	Baia 2		Lebens signification et technique de la substance blanche, liaison de gestion	2010			HHH2	AG					
CH-1906	M	48	34	Faillite/ventilation post-op		T	NC		Lebens signification et technique de la substance blanche, liaison de gestion	01/09/2013	01/09/2013		HHH1	AG					
CH-1412	M	72	18	Asst cardiaque		T	Baia 2		Thrombose veineuse profonde et prévention de la thrombose veineuse profonde	07/09/2013	07/09/2013		HHH1	AG					
CH-2340	M	50	24	Choc septique grave		T	Baia 0		Thrombose veineuse profonde et prévention de la thrombose veineuse profonde	01/09/2013	01/09/2013		HHH2	AG					
CH-2375	F	81	8	Empoisonnement par métaux lourds		T	Baia 1,2		Empoisonnement par métaux lourds	2010			HHH1	AA					
CH-01637	M	61	NC	Diète sans ammoniac		T	NC		Diète sans ammoniac	23/09/2013	23/09/2013		HHH2	GG					

CM-0626	F	52	29	ACT basal à J10	T	NC	Détection anticorps dirigée depuis la paroi des tumeurs abdominales. Contingence pulmonaire avec odème alvéolaire (Hx). Échantillon péritonéal	07/08/2013	07/08/2013	E3E3	HNH2	GG	20/01/2014	20/01/2014	9.9	9.7	OU
CM-0624	M	59	13	Clou à septum point de départ cœléral à post	T	NC	Cause d'écoulement, inf pour un tumeur, multiples métastases en rapport avec une CIVD.	31/07/2013	31/07/2013	E3E3	HHH	AG	27/01/2014	27/01/2014	8	6	OU
CM-0925	M	61	20	Débitance multilobulée	T	Bank 1	Lésion d'ischémie sous corticale en rapport avec une artérodépression. Pas de lésion tumorale. Pour le reste du corps : ACP pulmonaire moyennement différencié + cardiomyopathie ischémique. Nécrose après dénaturation multilobulée.	07/08/2013	26/07/2013	E3E3	HNH2	AG	27/01/2014	27/01/2014	7.2	8.8	OU
CM-2228	M	53	29	Décès vital sans signes précurseurs suite à l'obstruction	T	NC	Néoplasme pulmonaire - sans anomalies du parenchyme adhérent et absence de quelques lésions ischémiques après hypoxiques. Tumeur à contenu VD	04/09/2013	04/09/2013	E3E3	HHH	GG	22/01/2014	22/01/2014	7.6	6.2	OU
CM-3449	M	41	11	Mari subite à domicile	T	NC	Faiblesse totale. Préventive cœléral annuel	14/08/2016	14/08/2016		HHH	GG					
CM-0712	F	76	14	Engorgement sur ACP hépatogène	T	NC	2 lésions hépatogènes signes symptomatiques interlobulaires et tuberculaires associées à d'autres hépatogènes corticales corticales. Lésions ischémiques et hépatogènes d'âge indéterminé. Signes ischémiques hépatogènes.	14/08/2016	14/08/2016		HNH2	GG					
CM-1928	M	97	36	NC	T	Bank 1	MA Bank 1 + présence au premier plan de lésions ischémiques subaiguës et chroniques, de localisation CSD, d'âge indéterminé.	14/08/2016	14/08/2016		HNH2	AG					
G 1	M	88	7	1995	T	Bank 1	NC	14/08/2016	14/08/2016		HNH2	AG					
G 5	M	80	28	1995	T	Bank 1	NC	14/08/2016	14/08/2016		HHH	GG					
G 4	F	79	8	1995	T	Bank 1	NC	14/08/2016	14/08/2016		HHH	AG					
G 69	F	95	3	1995	T	Bank 1	NC	14/08/2016	14/08/2016		HHH	AG					
P-314	M	94	49	NC	T	NC	Lésions disséminées de démýelisation	22/07/2013		E3E4	HNH2	AG					
P-3589	M	69	6	NC	T	Bank 2	NC	01/07/2014	01/07/2014	E3E3	HHH	AG	20/11/2014	20/11/2014	5.3	5.8	OU
P-382	M	69	5.5	NC	T	Bank 1,2	NC	11/05/2016	11/05/2016		HHH	GG					
P-4078	M	73	10	NC	T	Bank 2	NC	11/05/2016	11/05/2016		HHH	AA					
P-5005	M	92	NC	NC	T	NC	Lésions disséminées pericentriques	04/08/2013	04/08/2013	E3E4	H2H2	GG	22/01/2014	22/01/2014	9.4	6	OU
P-5453	F	52	29	NC	T	Bank 2	Lésion Alzheimer Bank 2	20/09/2014	20/09/2014	E2E3	HHH	AG	10/11/2014	10/11/2014	7.7	7	OU
P-5603	F	92	21	NC	T	NC	NC	20/09/2014	20/09/2014	E3E3	HHH	AA	20/04/2014	20/04/2014	8.4	5.5	OU
P-6263	F	83	21	NC	T	NC	NC	20/09/2014	20/09/2014	E3E3	HNH2	GG	20/04/2014	20/04/2014	4.8	5.7	OU
P-7197	M	65	10	NC	T	NC	Quelques corps de Lewy dans NBL et substance noire	02/07/2014	02/07/2014	E3E4	HHH	AG	20/11/2014	20/11/2014	7.9	5.1	OU
P-8401	F	69	28	NC	T	NC	NC	02/07/2014	02/07/2014	E3E3	HNH2	AG	10/11/2014	10/11/2014	7.2	6.2	OU
P-8521	F	79	NC	NC	T	NC	NC	02/07/2014	02/07/2014	E3E3	HHH	AG	10/11/2014	10/11/2014	8.2	7.8	OU
P-8720	M	82	NC	NC	T	NC	NC	02/07/2014	02/07/2014	E3E3	HHH	GG	10/11/2014	10/11/2014	6.8	4	OU
P-8886	M	94	15.5	NC	T	NC	NC	02/07/2014	02/07/2014	E2E3	HHH	AG	10/11/2014	10/11/2014	8.8	8.6	OU

Tableau 9 : Base de prélèvements cérébraux humains de tauopathies.

ANNEXE 2 : Exemple de séquençage Sanger après bisulfite

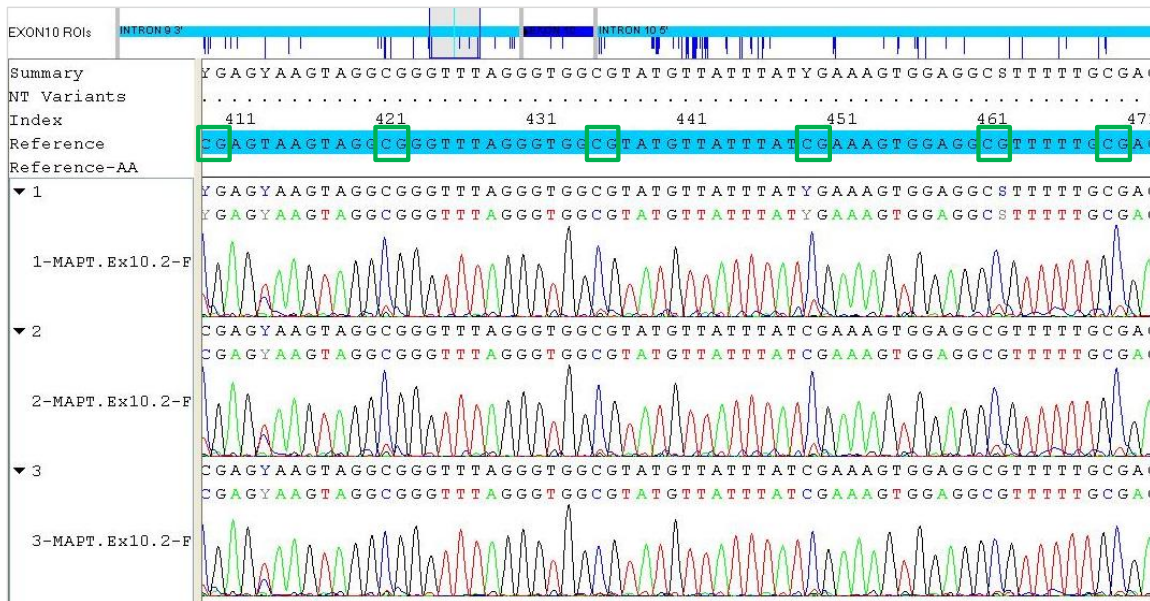


Figure 42 : Electrophorogramme après traitement au bisulfite de l'intron 9 de *MAPT*.

Capture d'écran du logiciel SeqScape® v2.5 (Applied Biosystems). La séquence de référence surlignée en bleu correspond à la séquence de l'intron 9 du gène *MAPT* après traitement au bisulfite. Les sites CpG sont encadrés en vert. Les CpG partiellement méthylés prennent un aspect de double pic bleu (cytosine non converti par bisulfite) et rouge (thymine). Les 6 CpG correspondent au CpG de la région de l'exon 10 que nous avons codé de 11 à 16.

ANNEXE 3 : Exemple de pyroséquence

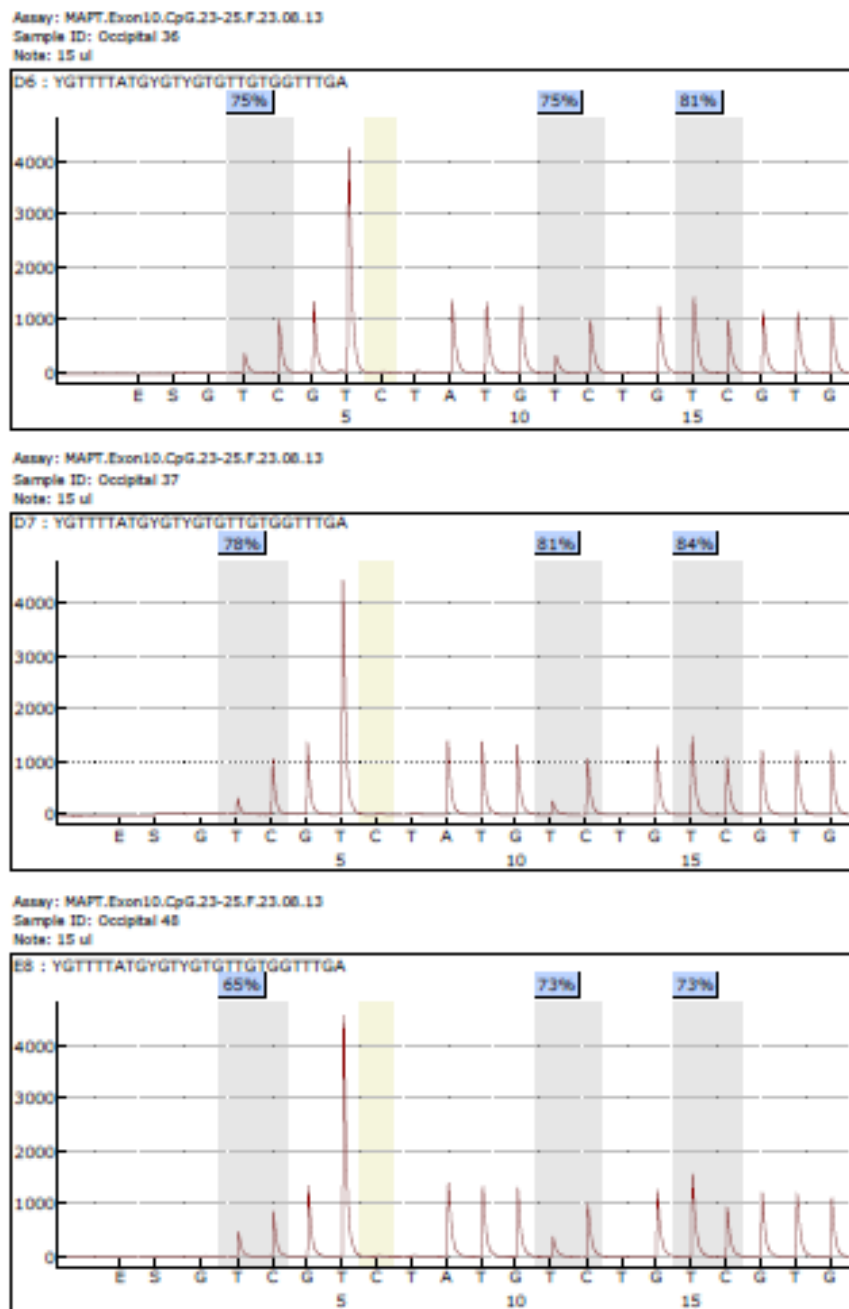


Figure 43 : Pyroséquence de l'intron 10 de *MAPT*.

Exemple de pyrogramme obtenu avec le logiciel Pyromark Q24 software (Qiagen). Les trois pyrogrammes correspondent à trois échantillons différents. A chaque pic est attribué un type de nucléotide et l'intensité des pics correspond au nombre de nucléotides identiques à la suite (généralement de 1 à 5). Les pics d'intensités variables et colorés en gris correspondent aux cytosines méthylées. La région colorée en jaune correspond à un témoin de conversion du traitement au bisulfite. En cas de conversion incomplète, il est possible d'observer un pic dans la région du témoin de conversion. Dans le cas présent, les témoins de conversion sont négatifs ce qui autorise l'analyse des échantillons. Les trois CpGs présentées correspondent aux CpG 23, 24 et 25 de la figure 27.